

CHO 細胞を利用した
高効率バイオロジクス生産系の開発

2015 年 3 月

奥村 武

目次

第1章.序論	6
1.1 医薬品のトレンド	6
1.2 バイオ医薬品（抗体医薬品）	6
1.3 抗体医薬品の課題	7
1.4 抗体製造プロセス開発	8
1.5 本研究の目的	8
1.6 本研究の背景と概要	9
1.6.1 第2章「高生産を実現する宿主細胞の開発」	9
1.6.2 第3章「抗体遺伝子導入方法の検討」	9
1.6.3 第4章「高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発」	9
第2章.高生産を実現する宿主細胞の開発	10
2.1 無血清・浮遊馴化過程の細胞の特性解析及び宿主細胞の開発	10
2.1.1 要旨	10
2.1.2 背景	10
2.1.3 実験材料及び実験方法	12
2.1.3.1 培地	12
2.1.3.2 接着細胞（CHO-K1）の無血清・浮遊馴化	13
2.1.3.3 宿主細胞 CHO-O1（PDL0～PDL100）の作製	13
2.1.3.4 増殖特性評価	14
2.1.3.5 接着性評価	14
2.1.3.6 抗体発現ベクター	14
2.1.3.7 抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得	15
2.1.3.8 Fed Batch 培養	15
2.1.3.9 レクチンアレイ解析	15
2.1.3.10 レクチンキャプチャー	15
2.1.4 結果	16
2.1.4.1 無血清・浮遊馴化及び CHO-O1（PDL0～PDL100）の作製	16
2.1.4.2 増殖性評価	16
2.1.4.3 接着性評価	17
2.1.4.4 抗体生産性評価及び産生抗体の品質評価	18
2.1.4.5 レクチンアレイ解析	19
2.1.4.6 レクチンキャプチャー	20
2.1.5 まとめ	21
2.2 抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変	23
2.2.1 要旨	23

2.2.2	背景.....	23
2.2.3	実験材料及び実験方法.....	25
2.2.3.1	抗体生産株#544	25
2.2.3.2	培地	25
2.2.3.3	不均衡変異導入法	25
2.2.3.4	24 well plate による Batch 培養	26
2.2.3.5	Fed Batch 培養	26
2.2.3.6	Genomic PCR 法による変異型ポリメラーゼ発現ベクターの検出.....	27
2.2.3.7	Cre-loxP 部位特異的組換えによって除去された抗体遺伝子の検出	27
2.2.3.8	Genomic PCR 法による Cre 発現ベクターの検出.....	27
2.2.3.9	再導入評価（抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得）	28
2.2.4	結果.....	28
2.2.4.1	変異体ライブラリーの作製（第 1 ラウンド）と変異導入率.....	28
2.2.4.2	高生産株スクリーニング（第 1 ラウンド）	29
2.2.4.3	変異型ポリメラーゼ発現ベクターの除去.....	30
2.2.4.4	選抜候補 24 株の Fed Batch 培養評価	31
2.2.4.5	Cre-loxP 部位特異的組換えによる抗体遺伝子の除去	32
2.2.4.6	第 2 ラウンドに向けた株選定	33
2.2.4.7	不均衡変異導入技術を利用した改変細胞の取得（第 3 ラウンド後）	33
2.2.5	まとめ.....	35
第 3 章.抗体遺伝子導入方法の検討.....		37
3.1	<i>hprt</i> 遺伝子座を標的とした抗体遺伝子導入方法.....	37
3.1.1	要旨	37
3.1.2	背景.....	37
3.1.3	実験材料及び実験方法.....	38
3.1.3.1	宿主細胞	38
3.1.3.2	抗体発現ベクター	38
3.1.3.3	選択薬剤（puromycin、6TG、G418）と最小生育阻止濃度の検討	39
3.1.3.4	PDL38 の <i>hprt</i> 遺伝子座ホモロジーアーム対応配列の確認.....	39
3.1.3.5	CHO-O1 PDL38 に存在する <i>hprt</i> 遺伝子数の確認.....	40
3.1.3.6	抗体遺伝子を発現する <i>hprt</i> 部位特異的組換えベクターの構築及び <i>hprt</i> 組換え細胞の構築	40
3.1.3.7	<i>hprt</i> 組換え体の無血清・浮遊馴化.....	41
3.1.3.8	<i>hprt</i> 組換え抗体生産株の Batch 培養及び継代安定性評価.....	41
3.1.3.9	<i>hprt</i> 組換え抗体生産株の Fed Batch 培養及び品質評価.....	41
3.1.4	結果.....	42
3.1.4.1	CHO-O1 PDL38 の特性解析	42

3.1.4.2	<i>hprt</i> 組換え株の作製.....	43
3.1.4.3	<i>hprt</i> 組換え株の無血清・浮遊馴化及び特性解析	45
3.1.5	まとめ	48
3.2	マウス由来人工染色体 (Mouse artificial chromosome, MAC) ベクターを利用した抗体生 産株の構築	50
3.2.1	要旨	50
3.2.2	背景	50
3.2.3	実験材料及び実験方法	51
3.2.3.1	MAC 改変ベクター X3.1-LcHc	51
3.2.3.2	MAC への目的遺伝子搭載	51
3.2.3.3	染色体標本作製	52
3.2.3.4	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) 解析	52
3.2.3.5	微小核細胞融合法による染色体移入	53
3.2.3.6	Fed Batch 培養	53
3.2.4	結果	54
3.2.4.1	目的遺伝子搭載 MAC 保有細胞 (A9 細胞) の取得	54
3.2.4.2	CHO-O1 PDL38 由来の目的遺伝子搭載 MAC 保有細胞の取得	57
3.2.4.3	目的遺伝子を保持した MAC 保有細胞の Fed Batch 培養及び安定性評価	59
3.2.5	まとめ	61
第 4 章	高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発	62
4.1	フローサイトメトリー (FCM) を利用した抗体高生産細胞の濃縮方法の開発	62
4.1.1	要旨	62
4.1.2	背景	62
4.1.3	実験材料及び実験方法	63
4.1.3.1	培地及び各種試液	63
4.1.3.2	抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得	64
4.1.3.3	フローサイトメトリー (FCM)	64
4.1.3.4	Fed Batch 培養	65
4.1.3.5	細胞周期解析	65
4.1.3.6	透過型電子顕微鏡による観察	65
4.1.4	結果	66
4.1.4.1	蛍光強度を指標にした細胞分離	66
4.1.4.2	Forward Scatter (FSC) と Side Scatter (SSC) を指標とした細胞分離	66
4.1.4.3	8 分画した細胞の細胞周期解析	68
4.1.4.4	FCM を繰り返すことによる高生産細胞の濃縮効果	69
4.1.4.5	透過型電子顕微鏡によるオルガネラ観察	72
4.1.5	まとめ	72

4.2	96 deep well plate (DWP) を利用した抗体生産性評価系の開発.....	75
4.2.1	要旨.....	75
4.2.2	背景.....	75
4.2.3	実験材料及び実験方法.....	76
4.2.3.2	抗体生産株.....	76
4.2.4	結果.....	76
4.2.4.1	プレートの種類及び振盪速度検討.....	76
4.2.4.2	フィード方法の検討.....	78
4.2.4.3	培地の安定性評価検討-1.....	80
4.2.5	まとめ.....	81
第 5 章	総括.....	82
参考文献	86
謝辞	95

第1章. 序論

1.1 医薬品のトレンド

世界の医薬品の市場規模は年々拡大している。1997年に2939億ドルであった市場規模は、2007年には7148億ドルと10年間で約2.4倍に成長し、2013年には9801億ドルに達した(1,2)。

このように、世界規模で成長している医薬品市場を医薬品の売上から分類した場合、2000年の医薬品世界売上ベスト10にはバイオ医薬品は1品目(8位 エスポー®)であったのに対し、2013年には抗体医薬品を始めとするバイオ医薬品が7品目(1位 ヒュミラ®, 2位 レミケード®, 3位 リツキシサン®, 4位 エンブレル®, 6位 ランタス®, 7位 アバスチン®, 8位 ハーセプチン®)もランクインしており、低分子医薬品から高分子(バイオ)医薬品へと医薬品開発のトレンドに鮮明な変化がみられる(1,3)。さらに、これらのバイオ医薬品の売上高は、2000年の1位であるロゼック®(抗潰瘍剤)の売上高(6,260 M\$)を全ての品目が上回っており(ハーセプチンの売上高; 6,827 M\$)、バイオ医薬品が医薬品の市場規模の拡大を牽引している(3)。

日本市場も、1997年から2007年までの10年間で、その売上が469億ドルから657億ドルに増加したことから市場規模は間違いなく拡大しているが、その成長率は他の先進国(米国283%増、フランス230%増、ドイツ203%増)や新興国(中国354%増、インド274%増)に比べて低く、140%増に留まった(1)。これは、日本の医療費に占める高い薬剤費率(日(31.0%)>>仏(19.9%)>独(17.1%)>英(16.4%)>米(11.3); 1995年統計)(4)を背景に日本政府が膨らむ医療費を抑制するため、厳しく薬剤費の削減に取り組んできたためである。にもかかわらずバイオ医薬品の市場は急成長しており、今後この市場を支える方策を考え出す必要が生じている。

1.2 バイオ医薬品(抗体医薬品)

バイオ医薬品とは、バイオテクノロジー(遺伝子組換え技術、細胞融合法、細胞大量培養法など)を用いて製造された医薬品であり、一般的に生体内にあるタンパク質を有効成分として利用している。バイオ医薬品には、酵素、ホルモン、ワクチン、サイトカイン類(インターフェロン、エリスロポエチンなど)、抗体等がある。日本で承認された主なバイオ医薬品には、1980年代ではヒトインスリン、成長ホルモン、B型肝炎ワクチン、インターフェロン類、1990年代ではエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、組織プラスミノゲン活性化因子、ナトリウム利尿ペプチドなどがあり、2000年代には抗体であるリツキシサン®とハーセプチン®が分子標的型抗がん剤として開発、上市されたことによって、バイオ医薬品の中でも抗体(モノクローナル抗体)が注目される様になった(5,6)。

抗体は、Y字型をした4本鎖構造で、軽鎖・重鎖の2つのポリペプチド鎖が2本ずつジスルフィド結合で結合したヘテロテトラマーである。Y字の縦の部分はFc領域（Fragment, crystallizable）と呼ばれ、T細胞やNK細胞などの免疫細胞に認識される。一方、Y字の上半分の両側部分をFab領域（Fragment, antigen binding）と呼び、この先端部分が抗原と結合する。この先端部分は、アミノ酸配列が極めて多様であることから、この部分を可変領域、これ以外の部分は比較的アミノ酸配列が保たれているために定常領域と呼ばれる。抗体の分子量は約150 kDaで、Fc領域には、不均一なN型糖鎖が付加される。抗体は標的抗原に対して特異的に結合することによって薬効を示すことから、高い特異性と少ない副作用が期待され、様々な作用機序（結合阻害、抗体依存性細胞障害作用（ADCC：Antibody-dependent cellular cytotoxicity）、薬物輸送（DDS：Drug delivery system）など）を有する抗体医薬品が開発されている(7)。

1.3 抗体医薬品の課題

2014年までに日米欧で認可された抗体医薬品は43品目あり(8)、今後も増加が見込まれている。また、その市場規模は年10%の成長を維持し、2020年には81,500 M\$まで市場が拡大すると予測されている(9)。

一方で、抗体医薬品は、従来の低分子医薬品やエリスロポエチンを代表とするサイトカイン系のタンパク質性医薬品に比べ、投与量が格段に多く、また、製造コストが高ことから薬価が高額になり、薬剤費の高騰が問題となっている。例えば、乳がんの手術後再発予防に用いられるハーセプチン[®]の費用は年間300万円を超える（従来の化学療法剤は数十万円）(10)。このように抗体医薬品は治療費の高騰を引き起こすため、イギリスのように、治療効果が確認されているにもかかわらず、その効果が高くないものは承認しない、すなわち費用対効果を考慮した医療政策を行い、医療費の増加を抑制している国もある(11)。この問題に対し、Potelligent 技術や抗体薬物複合体化技術などの抗体の高活性化による投与量低減と抗体の高生産系の開発によるコスト低減によって、医療費の高騰に対する問題解決が図られようとしている(12)。しかしながら、抗体の高活性化は、抗体のMode of Action（MOA）によっては（例えば、アゴニスト抗体と言われるシグナリング抗体やアンタゴニスト抗体などの中和抗体などは）、難しく、生産系の改良による製造コストの低減が医療費の抑制には有効な手段となる。

1.4 抗体製造プロセス開発

抗体医薬品の生産には、抗体分子の特殊性（高分子、構造の複雑さ（ヘテロテトラマー、*N*型糖鎖付加））から、真核生物である動物の細胞、特にチャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary, CHO) 細胞が宿主として広く利用されている(8)。CHO 細胞を利用した抗体生産系の生産性は、1980 年代では数十～数百 mg/L 程度であったが、最近では、発現系（宿主 - ベクター）、培養条件や培地等の改良により数 g/L の生産性が期待できる様になっている(13–15)。抗体製造プロセス開発は、抗体生産細胞の構築、培養プロセス開発、精製プロセス開発からなり、細胞構築以外のプロセスについては、プラットフォーム化による効率化が進められている。これは、抗体分子が標的抗原が異なっても定常領域のアミノ酸配列はほぼ同じであり、同様な分子特性を示すことに基いている。一方、細胞構築については、発現させる抗体の種類によって生産性は異なり、安定的に高い生産性を達成するためには生産系の改良は引き続き重要な課題である。抗体生産細胞の抗体生産能力は、宿主の能力、発現ベクター（プロモーター、高発現、安定発現に効果を示す *cis* (DNA) エレメント、選択マーカー、抗体遺伝子コドンの最適化など）、さらに、発現ベクターの導入方法（宿主の染色体のどこに取り込まれるか（取り込ませるか））で決まる。そして、様々な生産能を有する細胞の集団から高い生産能力を有する細胞を取得するためには、スクリーニング方法が重要となってくる。また、培養プロセス開発における生産培地の開発も重要であり、これにより抗体生産株の生産能力を引き出し、生産性を向上させることができる。

1.5 本研究の目的

前述した通り、抗体医薬品は今後も継続的な成長が見込まれていること、また、高い薬剤費の抑制が望まれていることから、より高効率で安価に製造できるプロセスの開発が求められている。これを実現するためには、まず、出発物質である抗体生産細胞の構築プロセスに着目し、宿主、発現ベクター、発現ベクターの導入方法、そして、スクリーニング方法を開発することが肝要である。これまでの我々の研究から、目的遺伝子の高発現を実現する新規プロモーター、目的遺伝子の発現を促進する DNA エレメントを搭載した抗体発現ベクター pDSLH4.1 が開発されている (unpublished data)。

本研究では、抗体をはじめバイオ医薬品の生産に適応可能な高効率バイオリジクス生産系を開発することを目的に、第 2 章では「高生産を実現する宿主細胞の開発」、第 3 章では「抗体遺伝子導入方法の検討」、そして第 4 章では「高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発」を行った。

1.6 本研究の背景と概要

1.6.1 第2章「高生産を実現する宿主細胞の開発」

第2章 第1節「無血清・浮遊馴化過程の細胞の特性解析及び宿主細胞の開発」では、接着細胞である CHO-K1 ATCC® CCL-61™ から無血清・浮遊馴化したと判断した時点の細胞を起点に、さらに継代して得られる一連の細胞について、その特性（増殖性、接着性、抗体生産能、レクチンアレイ解析）を解析し、その結果から、抗体生産に適した宿主細胞を構築した。

第2章 第2節「抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変」では、第1節の宿主細胞を用いて構築した抗体生産株に対し、株式会社ネオ・モルガン研究所の不均衡変異導入技術(16-18)を利用して、宿主細胞のゲノム DNA に網羅的な変異を導入し、複数の遺伝子が up-, down- regulation されることで生産能力が向上した改変細胞の取得を試みた。

1.6.2 第3章「抗体遺伝子導入方法の検討」

第3章 第1節「*hprt* 遺伝子座を標的とした抗体遺伝子導入方法」では、TOTO 株式会社の *hprt* 遺伝子座（ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）への部位特異的相同組換え技術(19)を利用して抗体生産株を構築し、その生産性や安定性を確認することで、*hprt* 遺伝子座における部位特異的相同組換え技術を評価した。

第3章 第4節「マウス由来人工染色体（Mouse artificial chromosome, MAC）ベクターを利用した抗体生産株の構築」では、上記、部位特異的相同組換え技術と同様な効果が期待される鳥取大学大学院 医学系研究科 押村 光雄教授らが開発したマウス由来人工染色体（MAC）ベクター(20,21)を利用した抗体生産株の構築と、その生産性や安定性を指標に、MAC ベクター技術を評価した。

1.6.3 第4章「高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発」

第4章 第1節「フローサイトメトリー（FCM）を利用した高生産細胞の濃縮方法の開発」では、ハイスループットで細胞を解析、単離することができる FCM に着目し、網羅的かつ高効率な高生産細胞の濃縮方法について検討した。

第4章 第2節「96 deep well plate（DWP）を利用した抗体生産性評価系の開発」では、簡便かつ高いスループットが期待できる方法として、96 deep well plate（DWP）を利用した抗体生産性評価系を検討した。

第2章. 高生産を実現する宿主細胞の開発

2.1 無血清・浮遊馴化過程の細胞の特性解析及び宿主細胞の開発

2.1.1 要旨

本章では、CHO 細胞を無血清・浮遊馴化させ、その後、馴化過程を継続した一連の細胞を解析することで、抗体生産に適した宿主の開発を目的とした。CHO-K1 ATCC[®] CCL-61[™]細胞から無血清・浮遊馴化したと判断した時点の細胞を PDL (集団倍加レベル; Population doubling level) 0 とし、さらに継代して得られる一連の細胞 (PDL0~PDL100) について特性解析 (増殖性、接着性、抗体生産能、レクチンアレイ解析) を行った。その結果、継代を経るほど、増殖性は向上、接着性は低下した。また、継代と共に抗体生産能は向上するが PDL38 付近で極大を示し、細胞表層の糖鎖における $\alpha 2, 3$ シアル酸量は低下するが PDL28 付近で極小を示し、細胞表層の $\alpha 2, 3$ シアル酸含量と抗体生産能との間に相関関係が見出された。さらに、 $\alpha 2, 3$ シアル酸を認識するレクチン、MAL (*Maackia amurensis* Lectin) を用いたレクチンキャプチャーにより、関連因子の同定を試みたところ、ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1) や Integrin などの接着因子が同定された。

以上の増殖性、生産性及び接着性の結果から、抗体生産に適した宿主細胞として PDL38 を樹立した。また、これら一連の細胞の特性解析結果から、抗体生産能と接着因子の質的量的変化の間に関連性が示唆された。

2.1.2 背景

CHO 細胞は 1958 年に Puck らによってチャイニーズハムスター卵巣組織から樹立され(22)、1968 年に Kao らにより分離された亜種 CHO-K1 細胞株が ATCC に寄託されている(23)。Figure 1 に示したとおり、現在、様々な CHO 細胞株が樹立されているが(22-31)、産業利用されている CHO 細胞株は CHO-K1 由来細胞株もしくはコロンビア大学の Chasin によって樹立されたジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 欠損株である CHO DG44 細胞株が主なものである(28)。

そこで、本研究では、接着細胞である CHO-K1 ATCC[®] CCL-61[™]から無血清・浮遊馴化したと判断した時点の細胞を PDL（集団倍加レベル；Population doubling level）0 とし、さらに継代して得られる一連の細胞（PDL0～PDL100）について特性解析（増殖性、接着性、抗体生産能、レクチンアレイ解析）を行い、抗体生産に適した宿主細胞を構築した。

2.1.3 実験材料及び実験方法

2.1.3.1 培地

2.1.3.1.1 10%(v/v) FBS/F12 培地

原材料名	メーカー	必要量
F-12 Nutrient Mixture	GIBCO	10.6 g
NaHCO ₃	SIGMA	1.176 g
FBS	Moregate	100 mL
HT Supplement (×100)	-	10 mL
注射用水	-	1000 mL

溶解後、0.2 μm フィルターで濾過滅菌

2.1.3.1.2 C/E 培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	500 mL
EX-CELL 325-PF	SAFC	500 mL
Glutamine 200 mM溶液	-	20 mL
HT Supplement (×100)	-	10 mL
Phenol red solution	SIGMA	0.5 mL

2.1.3.1.3 CD CHO 培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	1000 mL
Glutamine 200 mM溶液	-	20 mL
Phenol red solution	SIGMA	0.6 mL

2.1.3.1.4 宿主細胞継代培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	1000 mL
Glutamine 200 mM溶液	-	20 mL
Phenol red solution	SIGMA	0.6 mL
Pluronic F68	GIBCO	10 mL
Anti-Clumping Agent	GIBCO	1 mL

2.1.3.1.5 添加剤等

HT Supplement (×100) 溶液は、Hypoxanthine (ICN)、Thymidine (SIGMA) を各 1 mg/mL となるように PBS (-) (TaKaRa) に溶解後、0.2 µm フィルターで濾過滅菌して調製した。

また、Glutamine 200 mM 溶液は、L (+) グルタミン (和光純薬) を 29.2 mg/mL となるように超純水に溶解後に 0.2 µm フィルターで濾過滅菌して調製した。

2.1.3.2 接着細胞 (CHO-K1) の無血清・浮遊馴化

接着細胞である CHO-K1 ATCC® CCL-61™ (以下、CHO-K1) を American Type Culture Collection から購入し、これを無血清・浮遊馴化した。CHO-K1 はウシ胎児血清 (Fetal bovin serum ; FBS) を 10%(v/v) 添加した FBS/F12 培地 (10%(v/v) FBS/F12 培地) でフラスコ底面に接着して増殖する。無血清馴化は、10%(v/v) FBS/F12 培地から C/E 培地へ、その後、C/E 培地から CD CHO 培地に段階的に置き換えることによって行った。継代は、ピペッティングで剥がれてくる細胞で行い、さらに、浮遊細胞が多くなった時点で、静置培養から振盪培養に切り替え浮遊馴化を継続した。培養は初発細胞密度を 3.0×10^5 cells/mL に調製し、37°C、5% CO₂ インキュベーター中で T-25 フラスコによる静置培養、もしくは 125 mL 容三角フラスコによる振とう培養 (120 rpm、振幅 20 mm) にて行った。細胞密度は Burkert-Turk 血球計算盤で測定した。

2.1.3.3 宿主細胞 CHO-O1 (PDL0~PDL100) の作製

CHO-K1 から無血清・浮遊馴化した細胞を基点に、馴化操作を継続して一連の宿主細胞 CHO-O1 を作製した。無血清・浮遊馴化したと判断した時点の細胞を PDL0 として、これを宿主細胞継代培地にて培養した。播種密度は $1-3 \times 10^5$ cells/mL とし、3-4 日間毎に細胞を継代した (37°C、5% CO₂ インキュベーター内での振盪培養 (120 rpm、振幅 20 mm))。細胞密度は Burkert-Turk 血球計算盤または、Guava PCA (EMD Millipore Corporation) にて測定した。

2.1.3.4 増殖特性評価

CHO-O1 を宿主細胞継代培地にて約 1 ヶ月間、3-4 日間ごとに継代培養することで増殖性を評価した。継代培養は 125 mL 容三角フラスコにて培地量を 30 mL、播種密度は $1-3 \times 10^5$ cells/mL とし、37°C、5%CO₂ インキュベータ内で 120 rpm（振幅 20 mm）にて振とう培養を行った。細胞密度の測定は Guava PCA（EMD Millipore Corporation）を用いて行った。

2.1.3.5 接着性評価

接着性評価は、CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Assay (ECM Array, Fluorometric Format) (Cell Biolabs, Inc._Cat. No.CBA-071) を用いた。

1000×10^4 cells を遠心、上清を廃棄し、培地（CD-CHO with 6 mM L-Ala-Gln）10 mL に懸濁した。これを Assay Plate の各ウェルに 150 μ L 加え、30-90min 静置した（37°C, 5% CO₂）。培地を廃棄し、PBS（with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂）で洗浄、色素溶液を添加して、インキュベートした後、蛍光（480 nm/520 nm）にて測定した。

2.1.3.6 抗体発現ベクター

モノクローナル抗体の発現ベクターとして、pDSLH4.1 を使用した。pDSLH4.1 は抗体の重鎖、軽鎖の遺伝子と大腸菌での複製のためアンピシリン耐性遺伝子、さらに、CHO 細胞の選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子をコードしている。pDSLH4.1 の構造を Figure 2 に示した。

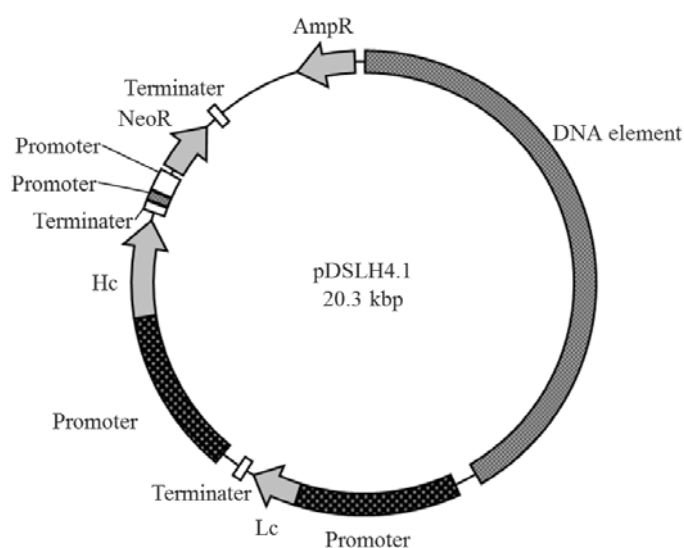


Figure 2 抗体発現ベクター pDSLH4.1 の構造

2.1.3.7 抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得

宿主細胞、CHO-O1 に対し、Neon™ Transfection System (Invitrogen) を用いて抗体発現ベクター pDSLH4.1 を導入した。C/E 培地にて 37°C、5% CO₂ の条件下、24 時間の静置培養後、Geneticin (Life Technologies Corporation) にて選択を開始した。トランスフェクションから約 2 週間後に、Geneticin に対する耐性を獲得した Stable Pool を取得した。

2.1.3.8 Fed Batch 培養

調製した Stable Pool を 125 mL 容三角フラスコにて、生産培地 (C/E) 30 mL、 3.0×10^5 cells/mL とし、37°C、5% CO₂、120 rpm で 14 日間 Fed Batch 培養した。培養 7 日目、10 日目、14 日目の培養液について、細胞密度と抗体濃度 (ProteinA-HPLC) を測定した。

2.1.3.9 レクチンアレイ解析

細胞表層に存在するタンパク質の糖鎖プロファイルをレクチンアレイにて解析した。

膜タンパク質の抽出は、CellLytic MEM Protein Extraction Kit (SIGMA) を用いた。 1.0×10^6 cells のペレットを溶解分離液で懸濁した後、プロトコールに従って疎水性タンパク質画分を回収した。BCA 法 (Micro BCA Protein Assay Kit (PIERCE)) にてタンパク質量を行った後、400 ng 分の疎水性タンパク質画分を 0.5% PBSTx に溶解した。Cy3-SE を添加し、1 時間、室温暗所で静置した後、ゲル濾過スピンカラム (GE Healthcare Sephadex G-25 fine) で精製したものを試料とした。マスキング処理を施した試料を LecChip™ Ver.1.0 (Glyco Technica) にアプライし 20°C、一晚反応させ蛍光を検出した。

2.1.3.10 レクチンキャプチャー

細胞表層に存在するタンパク質を $\alpha 2, 3$ シアル酸を認識するレクチン、MAL (*Maackia amurensis* Lectin) を用いてレクチンキャプチャーを行った。

膜タンパク質の抽出は、CellLytic MEM Protein Extraction Kit (SIGMA) を用いた。SA (Streptavidin) ビーズに Biotin 化 MAL (Vector Laboratories) を結合させ、そこにレクチンアレイ解析で調製した試料 (疎水性タンパク質画分) を供し、洗浄後、0.2% SDS/PBS 溶液で溶出した。

2.1.4 結果

2.1.4.1 無血清・浮遊馴化及び CHO-O1 (PDL0~PDL100) の作製

第1段階 (C/E 培地の混合比率を高め、C/E 培地に馴化させる) では、C/E 培地の比率 60% の段階 (血清濃度 4%) で 5 継代した以外は 2 継代毎に血清濃度を低下させることにより馴化した (血清濃度 10%→8%→6%→4%→2%→1%→0.5%→0.25%→0.1%→0%)。なお、C/E 培地比率 80% (血清濃度 2%) 以降は、静置培養から振とう培養へと培養法を変更した。さらに C/E 培地比率 97.5% (血清濃度 0.25%) 以降は、細胞凝集を防ぐ目的で Pluronic F68 (1vol%、Invitrogen) および Anti-Clumping Agent (0.1vol%、Invitrogen) を添加した。C/E 培地に完全に置き換えた段階 (血清濃度 0%) で 8 継代した後、第2段階 (C/E 培地から CD CHO 培地の混合比率を高め、CD CHO 培地へ馴化させる) を開始した。実際には CD CHO 培地の混合比率を 50%から 5~10%ずつその比率を高めて完全に CD CHO 培地に置換した。なお、無血清への馴化には約 4 ヶ月を要し、この段階で得られた細胞を PDL0 とした。引き続き継代培養を継続し、最終的に PDL0、PDL8、PDL15、PDL28、PDL38、PDL49、PDL58、PDL67、PDL100 の増殖状態の細胞を保存し、これら一連の細胞を CHO-O1 宿主とした。

2.1.4.2 増殖性評価

CHO-O1 PDL0、PDL8、PDL38、PDL100 を宿主細胞継代培地にて約 1 ヶ月間継代培養した。その結果を Figure 3 に示す。

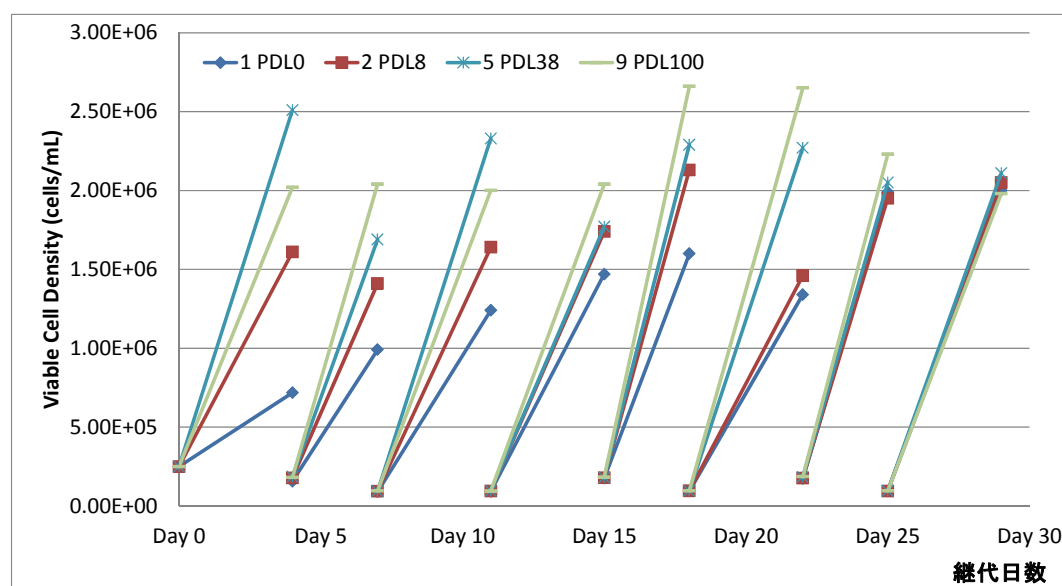


Figure 3 増殖特性 (CHO-O1 PDL0、PDL8、PDL38、PDL100)

増殖速度は、継代初期では、CHO-O1 PDL0<PDL8<PDL38≒PDL100 の傾向を示した。一方で、継代後期では、CHO-O1 PDL0≒PDL8≒PDL38≒PDL100 と差はなくなった。

2.1.4.3 接着性評価

CHO-O1 PDL0、PDL38、PDL100 を解凍し、これらを宿主細胞継代培地にて1継代した後、接着性を評価した。その結果（絶対値と相対値）を Figure 4 及び Figure 5 に示す。

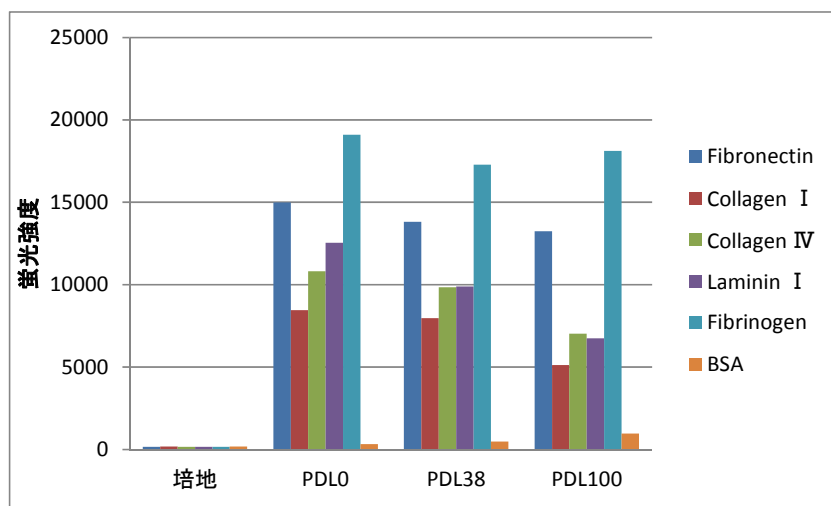


Figure 4 接着性評価（絶対値）

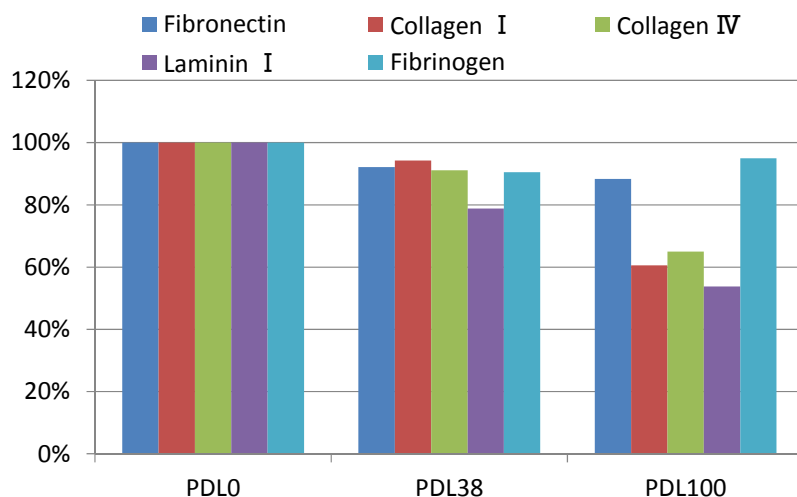


Figure 5 接着性評価（相対値：PDL0 を 100%）

この結果から、PDL の増加につれ、接着性が低下することが確認された。特に Collagen I 及びIVと Laminin I に対する接着性の低下が顕著であった。

2.1.4.4 抗体生産性評価及び産生抗体の品質評価

CHO-O1 PDL0、PDL8、PDL38、PDL100 に対し、Neon™ Transfection System (Invitrogen) を用いて抗体発現ベクターpDSLH4.1 をトランスフェクションし、それぞれの Stable Pool を作製した (N=3)。

得られた Stable Pool を 125 mL 容三角フラスコで Fed Batch 培養にて評価した。細胞密度と生存率は、Guava PCA (EMD Millipore Corporation) にて測定した。初発細胞密度は、 3.0×10^5 cells/mL とし、生産培地 (C/E) で 37°C、120 rpm、5% CO₂ の条件下、14 日間培養した。フィード培地 (FM4Ae2) は、3 日目から培養終了まで、仕込み培地量の 5 %分を添加した。抗体濃度は、ProteinA-HPLC で分析した。その結果を Figure 6 に示す。

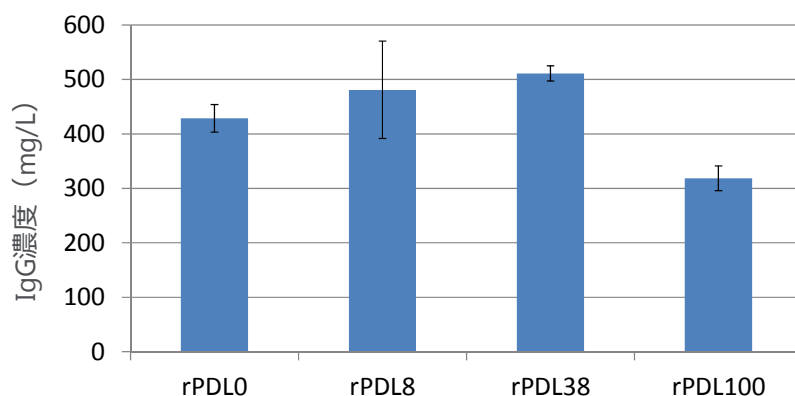


Figure 6 PDL0~PDL100 の生産性評価 (N=3)

この結果、生産性は CHO-O1 PDL8~PDL38 で極大を示し、より継代を重ねた CHO-O1 PDL100 は低い生産性を示した。続いて、CHO-O1 PDL8 以外のものについて、培養液中の抗体を ProteinA カラムにて精製し、糖鎖プロファイルを BlotGlyco (住友ベークライド) を用いて解析した。その結果を Figure 7 に示す。

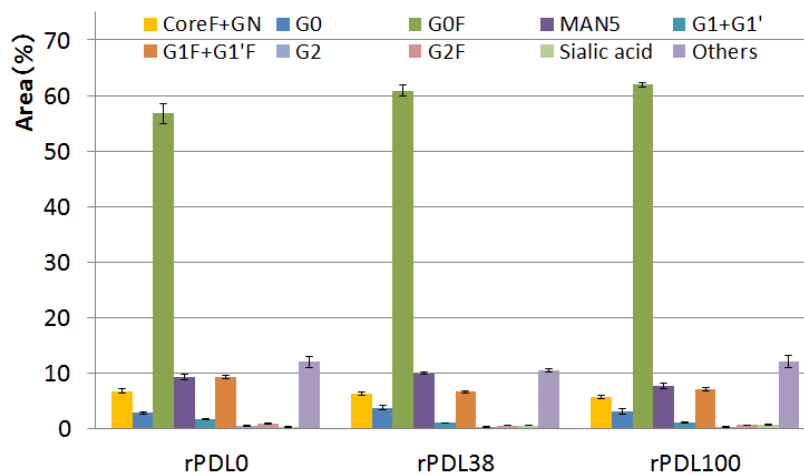


Figure 7 産生抗体の品質確認（糖鎖プロファイル）

異なる PDL 間で大きな差異はなく、継代の進度は、糖鎖プロファイルに影響を与えなかった。

2.1.4.5 レクチンアレイ解析

CHO-O1 PDL0～PDL100 の細胞膜タンパク質の糖鎖構造変化をレクチンアレイによって解析した。Figure 8 に、 α 2,3 シアル酸を認識する MAL によって得られた蛍光シグナルの値（MAL）を全レクチンの蛍光シグナルの平均値（MEAN）で除した値を示した。

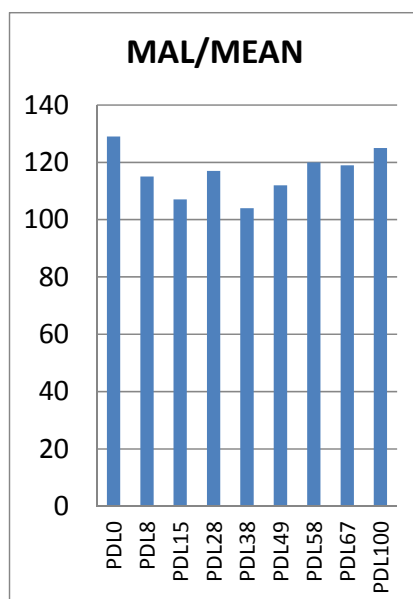


Figure 8 レクチンアレイの結果

この結果から、MAL/MEAN のシグナルは継代を進めるにつれて低下し、CHO-O1 PDL28 前後で極小を示した後、再度シグナルが上昇する結果となった。

2.1.4.6 レクチンキャプチャー

CHO-O1 PDL0～PDL67 について、細胞膜タンパク質を抽出し、レクチンキャプチャーを実施した。Input 及び Elution 画分を SDS-PAGE によって分画し、銀染色によって検出した電気泳動の結果を Figure 9 に示した。

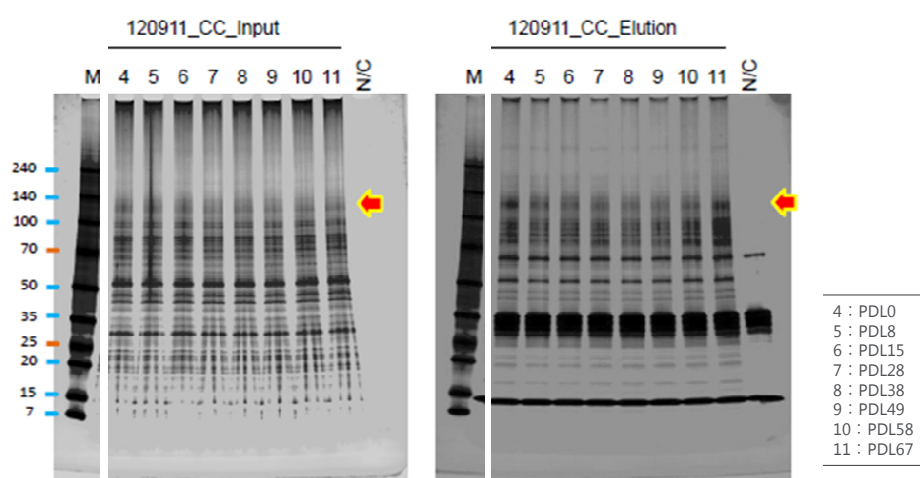


Figure 9 レクチンキャプチャー (Input, Elution)

この結果、分子量 130 kDa 付近に検出される一群のタンパク質は、レクチンアレイ解析 (MAL/MEAN) の結果と類似の検出挙動を示した。すなわち、MAL/MEAN のシグナルが強い PDL から得られたサンプルは、Elution の矢印で示した一群のタンパク質が強く検出された。これらのタンパク質を抽出し、質量分析により推定されたアミノ酸一次構造の相同性検索結果を Table 1 に示した。

Table 1 質量分析による関連因子の同定

Score	Protein
18	Exportin-1
12	Intercellular adhesion molecule 1
12	Exportin-2
12	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (Fragment)
12	Integrin alpha-V
9	Putative CD98 protein
9	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2
8	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
8	Prostaglandin F2 receptor negative regulator
7	Importin-7
7	ER membrane protein complex subunit 1
6	Integrin beta-1
6	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1

推定タンパク質の中に ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1) や Integrin などの接着因子 (灰色) が含まれ、さらに、核内や小胞体に局在するタンパク質である Exportin や Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 など含まれていることが推定された。

2.1.5 まとめ

本研究では、接着性細胞 CHO-K1 ATCC[®] CCL-61[™]を無血清・浮遊馴化して作製した CHO-O1 (PDL0~PDL100) について、その細胞工学的、生化学的特性解析を実施した。その結果、無血清・浮遊馴化できたと判断した後であっても、継代を継続することによって、細胞の増殖速度と接着性は変化する傾向を示していることが明らかになった。さらに、抗体の生産能については、継代回数の進行に伴い一方向に変化するわけではなく、CHO-O1 PDL8~PDL38 付近で極大を示し、さらに継代を進めた CHO-O1 PDL100 では生産性が低下する特徴的な傾向を示した。また、レクチンアレイの解析結果では $\alpha 2, 3$ シアル酸を認識する MAL に応答するシグナルが特徴的な傾向を示し、継代が進むにつれ PDL28 前後で極小を示したシグナルがその後上昇するという生産性とは逆の傾向を示した。一方で、異なる PDL の細胞を用いて生産した抗体の糖鎖構造を解析した結果、それらの糖鎖プロファイルに変化は認められなかった。従って、レクチンアレイで検出された MAL に対する蛍光シグナルの変化は、細胞表層に存在する糖タンパク質や糖脂質に起因することが示唆されたため、レクチンアレイの蛍光強度に変化を与えるタンパク質の同定を MAL によるレクチンキャプチャー法によ

って実施した。この結果、約 130 kDa 付近にレクチンアレイの結果を反映する一群のタンパク質を検出した。質量分析によって同定されたアミノ酸一次構造と相同性を示すタンパク質の中に、ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1) や Integrin などの接着因子が含まれていた。ICAM1 は、星状細胞の細胞表面に発現するリンパ球機能関連抗原-1 及びマクロファージ抗原-1 と相互作用することで、マクロファージ炎症性タンパク質-2 の発現を誘導するが、ICAM1 の糖鎖構造、特にシアル酸の有無、によって、その誘導活性が変化することが報告されている(42)。また、細胞の遊走や癌細胞における転移などに関与する Integrin に関しても、同様に糖鎖構造のシアル酸の有無で、細胞の遊走性が変化する。また、Integrin へのシアル酸の付加は、糖転移酵素ではなく、発癌タンパク質のゴルジリン酸タンパク質 3 の関与が報告されている(43)。これらの報告から、CHO-O1 PDL0～PDL100 における接着性などの様々な変化は、関連するタンパク質の発現量の変化だけではなく、糖鎖構造の変化によるタンパク質の機能変化に起因していることが推察され、また、この糖鎖構造の変化は糖転移酵素以外のタンパク質によっても引き起こされることから、CHO-O1 PDL0～PDL100 における増殖性、生産性及び接着性の変化は、接着因子などのタンパク質の発現量の変化と糖鎖構造の変化、さらに、ゴルジ体で機能するタンパク質の発現状態による、非常に複雑な要因で起こっていると推察された。

以上の結果は、増殖性、生産性及び接着性の観点から、抗体生産に適した宿主細胞として CHO-O1 PDL38 の選抜と宿主としての利用を支持する結果であった。さらに、生産性と接着因子の糖鎖構造の間に何らかの関連性があることを示唆する興味深い結果であった。

2.2 抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変

2.2.1 要旨

本章では、前節で構築した CHO-O1 PDL38 を宿主として、より抗体生産能力を向上させた宿主への改良を目指し、不均衡変異導入法を用いた宿主改変を試みた。レポータータンパク質として抗体を使用した。約 1.2 g/L の生産性を示す抗体生産株 (CHO-O1 PDL38 に抗体発現ベクター pDSLH4.1 を導入して構築した抗体生産株) に対して、①不均衡変異導入による変異ライブラリーの構築、②高生産細胞の選抜、③再導入評価を 1 ラウンドとして計 3 ラウンドの変異ライブラリーを構築した。スクリーニングの結果、親株と比較して、抗体の生産性が 2.2-2.5 倍向上した改良宿主の樹立に至った。本改良宿主では、レポーターとして使用した抗体のコード領域は、Cre-loxP 部位特異的組換え反応により抗体高生産能を付与した宿主細胞から除去できるように設計されており、宿主細胞として広く他の抗体の生産にも利用できる。

2.2.2 背景

これまでに生産性向上、品質向上、抗体の活性強化を目指した様々な宿主細胞の改変が報告されている。具体的には、抗アポトーシス関連遺伝子 (Bcl-2, Bcl-xl など) の過剰発現(44-53)、アポトーシス誘導経路 (caspase family など) の発現抑制(54-56)、細胞周期の制御(47,48,57-62)、により細胞密度及び生産性を向上させる方法。ピルビン酸カルボキシラーゼの過剰発現によるトリカルボン酸回路の強化(63)や乳酸脱水素酵素の部分欠失により代謝機構を改変し、毒性のある乳酸やアンモニアの蓄積を回避し、培養細胞にとって良好な培養環境を維持させることで生産性を向上させる方法(64-66)、cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) の down-regulation により低温培養時の増殖特性の改善と低温に対する馴化を促進させ生産性を向上させる方法(67,68)、シャペロン分子 (protein disulfide isomerase (PDI)、heavy chain-binding protein (BiP) など) の過剰発現による分泌経路の強化により生産性を向上させる方法(69-76)、糖転移酵素 (ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲなど) の過剰発現(12,77-79)や糖転移酵素遺伝子 (α 1, 6-フコース転移酵素など) の knock-out(80,81) により、糖鎖の均一化や抗体の antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) 活性、complement-dependent cytotoxicity (CDC) 活性の強化により、品質の向上、抗体の活性増強する方法などがある。しかしながら、これらの方法は目的とする改変細胞を取得するのに時間と労力を要することや特定の標的遺伝子のみの改変するため、大幅な改善効果は得られにくい。

これに対し、簡便に宿主のゲノム DNA 全体に変異を導入する方法がある。不均衡変異導

入法は、ラギング鎖の伸長反応を行うポリメラーゼ δ の校正機能を抑制した改良型ポリメラーゼ δ の導入によって、DNA 複製に伴って誘発される突然変異を効果的に蓄積させることが可能であるため、優れた変異導入法として宿主の育種に利用できる技術である。その他、紫外線や化学変異原などによる突然変異導入方法もあるが、これらの方法は遺伝子の欠損や細胞全体への物理的損傷を伴うこと、また、変異過程の優良な変異が次の変異によってマスクされる可能性があることから、ある一定以上に変異率を高め、優良な変異を蓄積することが困難である(82)。また、変異が導入される塩基にも偏りがあることも知られているため(83)、導入した変異を維持、固定することが容易ではない。これに対し、不均衡変異導入法は、偏りがなく穏やかな変異導入であり、その原理上、高い変異率を達成することが可能であり、優良な変異を維持しつつ、変異を多く蓄積することによって多様な突然変異種を得ることができる。

本研究では、第1節で構築した宿主細胞を用いて構築した抗体生産株に対し、株式会社ネオ・モルガン研究所の不均衡変異導入技術(16-18)を利用して、宿主細胞のゲノム DNA に網羅的な変異を導入し、複数の遺伝子の up-, down- regulation によって抗体生産能力が向上した改変細胞の取得を試みている。本研究内容の概要を Figure 10 に概説した。

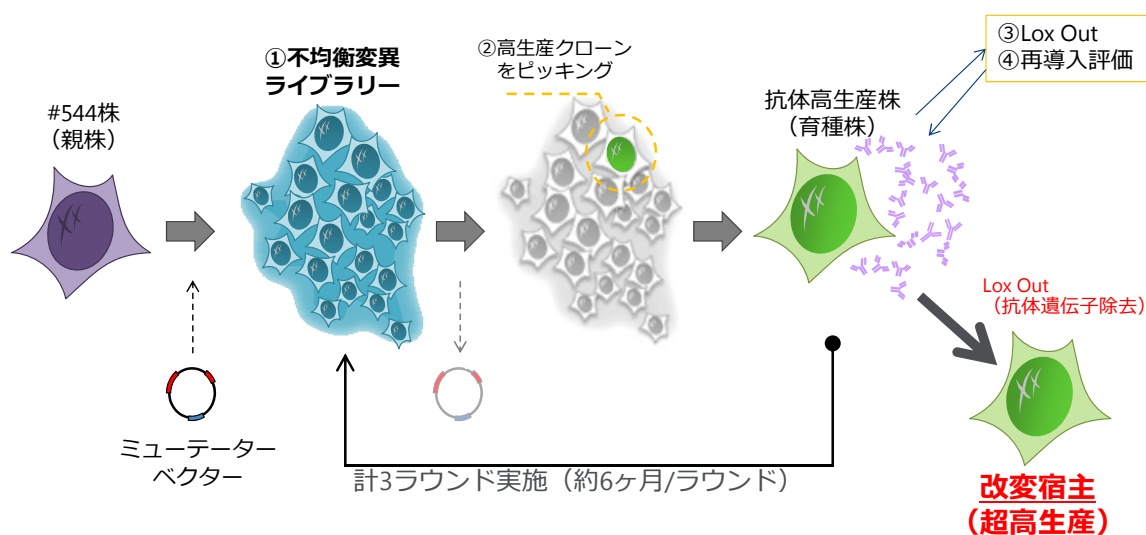


Figure 10 不均衡変異導入を利用した宿主改変の概要

2.2.3 実験材料及び実験方法

2.2.3.1 抗体生産株#544

宿主改変は、前節で構築した宿主細胞 CHO-O1 PDL38 に抗体発現ベクターpDSLH4.1 を導入して取得した抗体生産株#544 に対して行った。抗体生産株#544 は、14 日間の Fed Batch 培養によって約 1100 mg/L の抗体を生産することが可能である。

2.2.3.2 培地

2.2.3.2.1 改変細胞継代培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	600 mL
EX-CELL 325-PF	SAFC	400 mL
200 mM Alanine-glutamine	SIGMA	40 mL
Phenol red solution	SIGMA	0.6 mL
CHO Feed Bioreactor Supplement	SAFC	20 mL
100×HT supplement	GIBCO	10 mL
Geneticin	GIBCO	16 mL

2.2.3.2.2 生産用培地

評価に用いた生産培地（カスタム培地）は以下の 2 種類である。

Medium Name	Basal Medium	Feed Medium	Vender	Additives
生産培地-1	E32	FM4Ae2-G45	JX※	10 mM HEPES 1 mM L-Gln
生産培地-2	DA1	DAFM3	Life Technologies	10 mM HEPES 4 mM L-Gln

※JX Nippon Oil&Energy Corporation

2.2.3.3 不均衡変異導入法

Figure 11 に示す変異型ポリメラーゼ発現ベクターPolδ^{MKI1}/lox for CHO (Puromycin 耐性マーカー) を変異導入する細胞株に Fu GENE HD Transfection Reagent (Promega) によってトランスフェクションし、18 µg/mL の濃度になるよう Puromycin を添加した条件下、46 時間培養することによって変異導入ライブラリーを構築した。多様な変異導入率を期待し、導入する変異型ポリメラーゼ発現ベクターの量を 12 条件に設定した。

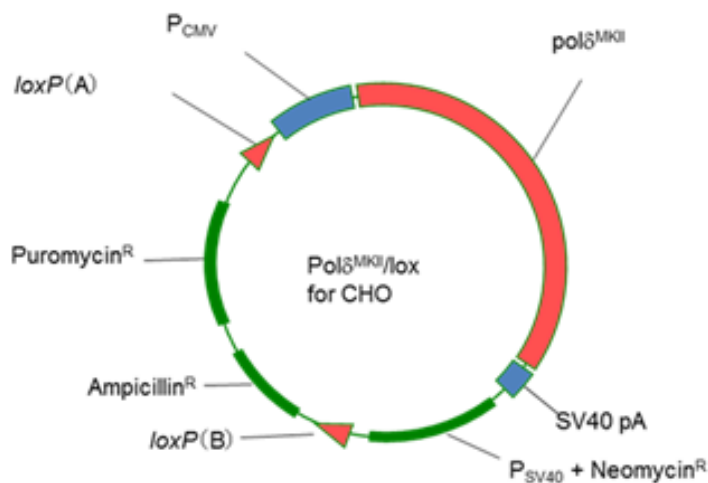


Figure 11 変異型ポリメラーゼ発現ベクターPol δ^{MKII} /lox for CHO の構造

Puromycin 存在下、増殖した細胞は、その後、Puromycin を含まない培地にて 7 日間培養し、12 セットの変異ライブラリーを構築した。得られた変異体ライブラリーの変異導入率は、Ouabain 耐性を獲得した変異体の出現頻度により算出した。変異体ライブラリーを 1 日間培養し、細胞を 2 mM Ouabain を含む培地にて、 2.0×10^6 cells/384 well plate となるように播種（各ライブラリーにつき N=3 で実施）。培養 8 日後に、Ouabain 耐性コロニーの数を顕微鏡で計測し、変異導入率を推定した。

2.2.3.4 24 well plate による Batch 培養

0.5 mL の改変細胞継代培地を仕込んだ 24 well plate に細胞を播種し、ウェル底面の 50% を超えるまで増殖させた。上清を除去し、900 μ L の生産培地を添加した後、37°C, 5% CO₂, 185 rpm で 7 日間培養した。抗体濃度は ProteinA-HPLC を用いて定量した。

2.2.3.5 Fed Batch 培養

細胞は、生産培地-1 または生産培地-2 で 3.0×10^5 cells/mL に調製された後、30 mL の培地を仕込んだ 125mL 容三角フラスコに接種し、37°C, 5% CO₂, 120 rpm で 14 日間または 17 日間培養した。Feed は培養 3 日目または 4 日目から行った。培養 7 日目、10 日目、14 日目、17 日目の培養液について、細胞密度と抗体濃度（ProteinA-HPLC）を測定した。

2.2.3.6 Genomic PCR 法による変異型ポリメラーゼ発現ベクターの検出

一過的に導入した変異型ポリメラーゼ発現ベクター (Polδ^{MKII}/lox for CHO) は、変異終了後、改良した細胞のゲノム DNA 中に残存していないことを genomic PCR 法にて確認した。

Polδ^{MKII}/lox for CHO に特異的なプライマーを用い、PrimeSTAR Max DNA polymerase (TaKaRa) にて目的 DNA 断片を増幅した。コントロールとしては、抗体発現ベクター pDSLH4.1 の DNA Element 領域が検出可能な特異的なプライマーによる PCR 反応によって確認した。Table 2 に PCR 条件を示す。

Table 2 PCR 反応条件

変異型 Polδ 発現ベクター

Prime STAR MAX Premix, 2x	12.5 μL
Primer Pol_Fw1 (10 μM)	1.5 μL
Primer Pol_Rv1 (10 μM)	1.5 μL
genomic DNA (50 ng/μL)	1.2 μL
DW	9.3 μL

25 μL

98°C 30s- (98°C 10s-68°C 5s-72°C 5s) x30

DNA Element 領域

Prime STAR MAX Premix, 2x	12.5 μL
Primer p508 (10 μM)	1.5 μL
Primer p509 (10 μM)	1.5 μL
genomic DNA (1 ng/μL)	1.2 μL
DW	9.3 μL

25 μL

98°C 30s- (98°C 10s-65°C 5s-72°C 5s) x30

2.2.3.7 Cre-loxP 部位特異的組換えによって除去された抗体遺伝子の検出

選抜した細胞に、Cre 発現ベクター pCre-PAC (Puromycin 耐性マーカー) を導入し、Puromycin 選抜によって一過的形質導入株を選抜した。Cre-loxP 部位特異的組換え反応終了後、抗体遺伝子は、細胞のゲノム DNA 中に残存していないことを genomic PCR 法にて確認した。抗体遺伝子の H 鎖、L 鎖、および Neomycin 耐性遺伝子、DNA Element に特異的なプライマーを PCR に使用した。抗体発現ベクターは、lox-out によって H 鎖、L 鎖、Neomycin 耐性遺伝子を含む領域のみが除去され、DNA Element 領域は、染色体上に残存するように設計された。

2.2.3.8 Genomic PCR 法による Cre 発現ベクターの検出

一過的に導入した Cre 発現ベクター pCre-PAC (Puromycin 耐性マーカー) がゲノム DNA 上に残存していないことを pCre-PAC に特異的なプライマーを用いて、genomic PCR 法による目的 DNA 領域の増幅によって確認した。

2.2.3.9 再導入評価（抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得）

Cre-loxP 部位特異的組換えによりレポータータンパク質である抗体の構造遺伝子を除去した改変細胞に対し、Neon™ Transfection System（Invitrogen）を用いて抗体発現ベクター pDSLH4.1 を導入した。改変細胞継代培地にて 37℃、5% CO₂ で 24 時間の静置培養後、Geneticin（Life Technologies Corporation）にて選択を開始した。トランスフェクションから約 2 週間後に、Geneticin への耐性能を示す Stable Pool を取得した。取得された Stable Pool は、Fed Batch 培養にて生産性を評価した。

2.2.4 結果

2.2.4.1 変異体ライブラリーの作製（第 1 ラウンド）と変異導入率

抗体生産株#544 に、変異型ポリメラーゼ発現ベクター Pol δ^{MKII} /lox for CHO（Puromycin 耐性マーカー）を一過的に導入し、18 μ g/mL の濃度の Puromycin を含む培地中で 46 時間培養した。さらに、Puromycin を含まない培地にて 7 日間培養することで、変異体ライブラリーを 12 セット作製した。得られた変異体ライブラリーの変異導入率は、Ouabain 耐性を獲得した変異体の出現頻度により算出した。Figure 12 に示すとおり、いずれのライブラリーにおいても数十倍から数百倍の範囲で十分な突然変異頻度の上昇が確認された。

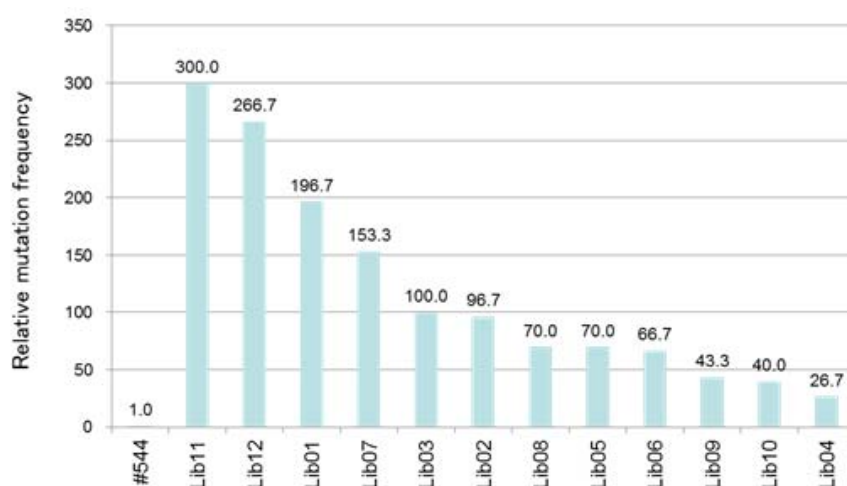


Figure 12 変異体ライブラリーの突然変異頻度相対値（親株#544 の頻度を 1 とした）

以上の結果から、幅広い変異頻度をカバーするよう Lib01, Lib03, Lib06, Lib08, Lib10, Lib11 の 6 セットのライブラリーを選抜し、第 1 ラウンド目のスクリーニングに供した。

2.2.4.2 高生産株スクリーニング（第1ラウンド）

6 セットの変異体ライブラリーから ClonePix™ FL（Molecular Devices）を用いて選抜した 600 株（1 セットの変異体ライブラリーから 100 株ずつ選抜）について、24 well plate による Batch 培養によって高生産株をスクリーニングした。さらに、生産上位株について、絞り込みを行い、最終的に Table 3 に示す通り、各ライブラリーから 4 株、計 24 株の高生産候補株を選抜した。

Table 3 高生産株のスクリーニング結果（第1ラウンド）

		予備検討	再検討	
Library	Strains	Titer (mg/L)	Titer (mg/L)	Ranking
Lib01	Lib01-056D	261	311	17
	Lib01-075D	218	333	14
	Lib01-025N	229	251	24
	Lib01-041N	280	296	22
Lib03	Lib03-121D	198	312	16
	Lib03-142D	248	364	8
	Lib03-065N	318	270	23
	Lib03-066N	190	302	19
Lib06	Lib06-248D	251	358	11
	Lib06-288D	229	384	3
	Lib06-117N	270	304	20
	Lib06-135N	216	301	21
Lib08	Lib08-303D	254	364	8
	Lib08-364D	283	371	6
	Lib08-167N	228	327	15
	Lib08-174N	215	343	12
Lib10	Lib10-388D	268	379	4
	Lib10-400D	219	368	7
	Lib10-207N	239	364	8
	Lib10-233N	194	374	5
Lib11	Lib11-484D	273	394	1
	Lib11-272N	239	309	18
	Lib11-288N	291	342	13
	Lib11-354N	Not Tested	388	2
Control	#544	Not Tested	~185	-

2.2.4.3 変異型ポリメラーゼ発現ベクターの除去

選抜した 24 株の高生産候補株について、一過的に導入した変異型ポリメラーゼ発現ベクター (Pol δ^{MKII} /lox for CHO) が細胞のゲノム DNA から除去されていることを確認するため、genomic PCR 法によって変異型ポリメラーゼ発現ベクター由来の DNA 断片の検出を試みた。全 24 株において、Pol δ^{MKII} /lox for CHO 由来の DNA 増幅断片は検出されず、ベクターがライブラリーより除去されていることを確認した。

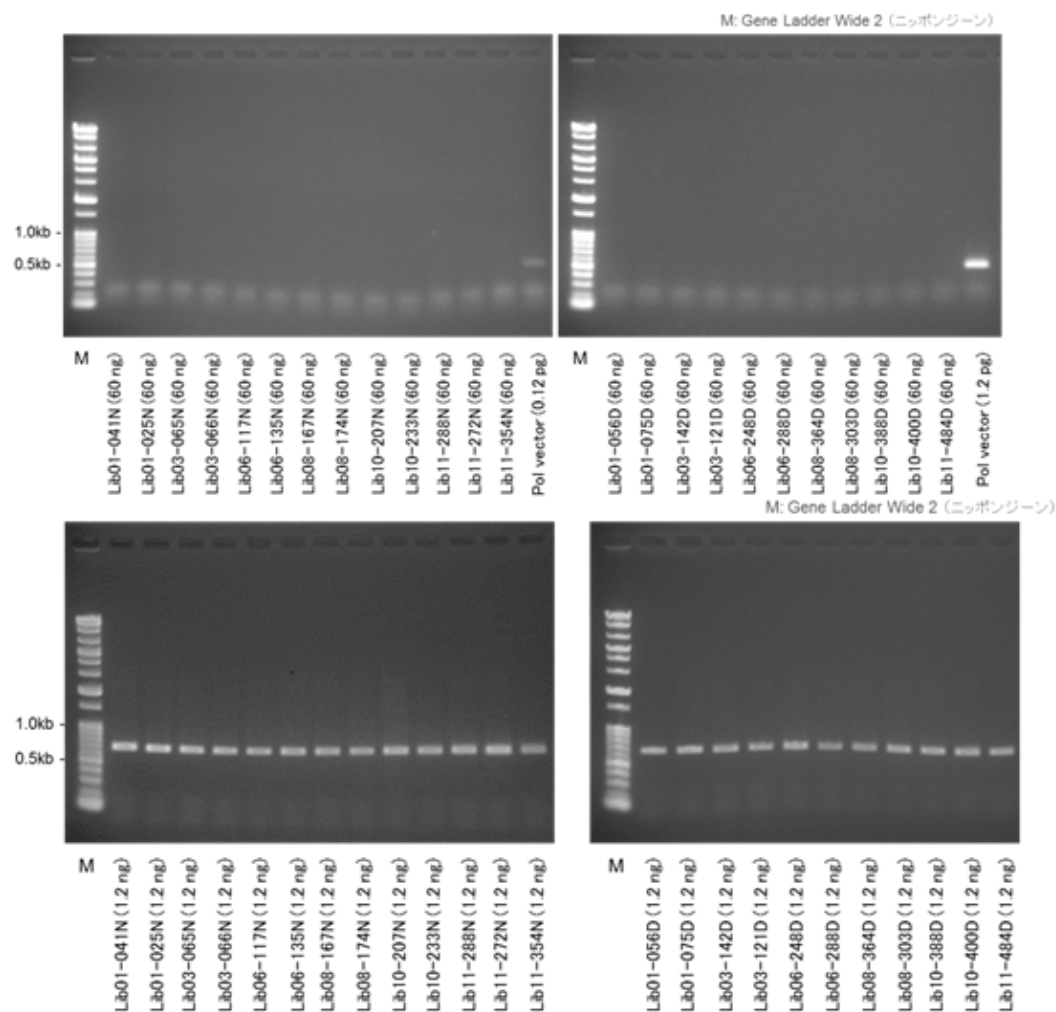


Figure 13 電気泳動 (PCR) による Pol δ^{MKII} /lox for CHO 残存確認

次に、24 株全てについて 125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養を行い、その生産性を再確認した。同時に、各ライブラリーの生産性第一位の株を選抜し、計 6 株について Cre-loxP 部位特異的組換え反応によって抗体遺伝子を除去した。

2.2.4.4 選抜候補 24 株の Fed Batch 培養評価

24 well plate による Batch 培養で選抜した 24 株について、125 mL 容三角フラスコによる 17 日間の Fed Batch 培養を実施した (Table 4)。

Table 4 Fed Batch の結果 (第 1 ラウンド後)

Library	Strains	Titer (mg/L)	Ranking
Lib01	Lib01-056D	962	10
	Lib01-075D	590	22
	Lib01-025N	916	15
	Lib01-041N	929	13
Lib03	Lib03-121D	923	14
	Lib03-142D	1185	4
	Lib03-065N	1202	2
	Lib03-066N	600	21
Lib06	Lib06-248D	1187	3
	Lib06-288D	1155	6
	Lib06-117N	435	23
	Lib06-135N	942	12
Lib08	Lib08-303D	644	20
	Lib08-364D	1185	4
	Lib08-167N	1335	1
	Lib08-174N	675	19
Lib10	Lib10-388D	952	11
	Lib10-400D	851	17
	Lib10-207N	680	18
	Lib10-233N	207	24
Lib11	Lib11-484D	965	9
	Lib11-272N	988	8
	Lib11-288N	873	16
	Lib11-354N	1111	7
Control	#544	914	-

125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養評価の結果、Lib03-142D 株、Lib03-065N 株、Lib06-248D 株、Lib06-288D 株、Lib08-167N 株、Lib08-364D 株が親株#544 よりも約 200 mg/L 程度高い産生性を示した。

2.2.4.5 Cre-*loxP* 部位特異的組換えによる抗体遺伝子の除去

24 well plate による Batch 培養の結果 (Table 3)、各ライブラリーにおける生産性第一位の株、Lib01-056D、Lib03-142D、Lib06-288D、Lib08-364D、Lib10-388D、Lib11-484D の 6 株を選抜し、Cre-loxP 部位特異的組換え反応により抗体遺伝子を除去した (各株からそれぞれ 9 株、計 54 株の Lox-out 株を取得)。Lox-out 株のゲノム DNA を鋳型に抗体遺伝子の有無を genomic PCR 法によって確認し、ゲノム DNA 上に抗体遺伝子が残存していないことを確認した (Figure 14)。

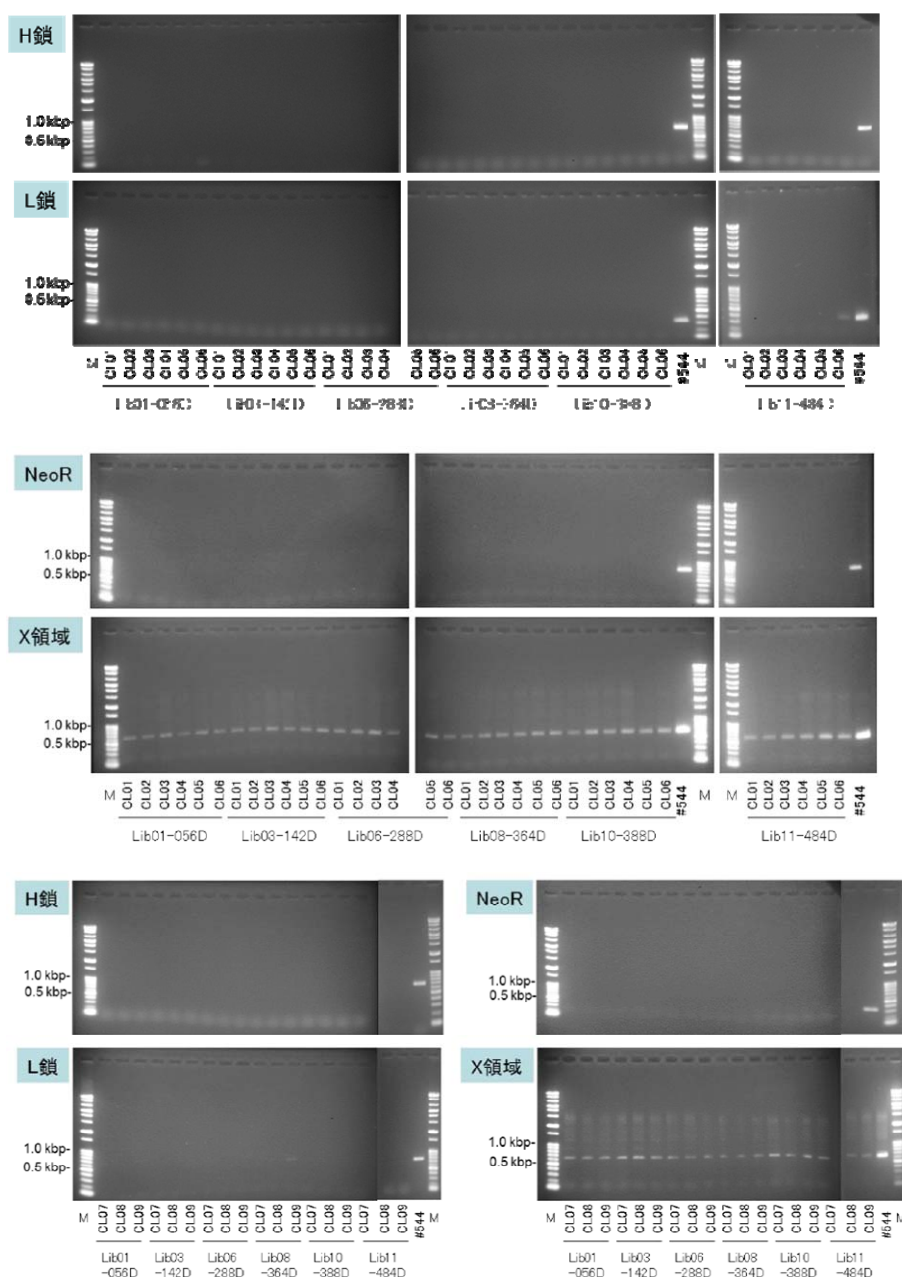


Figure 14 電気泳動（PCR）による抗体発現遺伝子除去確認（X=DNA Element）

この結果、Lib11-484D-CL06 および Lib08-364D-CL09 では軽鎖（L 鎖）由来の増幅断片が検出されたが、その他は全て H 鎖、L 鎖、Neomycin 耐性遺伝子由来の増幅断片は検出されず、抗体発現遺伝子の lox-out に成功したことが確認された。また、すべての株から DNA Element 領域由来の増幅断片が検出され、genomic PCR 反応が正常に機能していたことを確認した。

2.2.4.6 第 2 ラウンドに向けた株選定

125 mL 容三角フラスコでの Fed Batch 培養の結果、Lib03-142D 株、Lib03-065N 株、Lib06-248D 株、Lib06-288D 株、Lib08-167N 株、Lib08-364D 株が親株より生産性が向上していることを確認した。一方で、24 well plate による Batch 培養評価の結果を基に、各ライブラリーの生産性第一位の株（Lib01-056D, Lib03-142D, Lib06-288D, Lib08-364D, Lib10-388D, Lib11-484D）について、導入した抗体遺伝子の除去（lox-out）に成功したことから、第 2 ラウンドの変異ライブラリーは、この 6 株より構築した。抗体発現ベクターの再導入後、Stable Pool を取得し、その生産性を Fed Batch 培養により評価した結果、Lib10-388D 及び Lib11-484D は抗体発現ベクターの導入時に生存率が著しく低下した。これは、膜構造などに影響を与えるような変異が導入されたためと推察された。また、Lib01-056D は、Fed Batch 培養の結果が他の株に比べて低い生産性を示したこと、再導入評価における Stable Pool の Fed Batch 培養の結果においても生産性が低かったことから、Lib01-056D、Lib10-388D、Lib11-484D の 3 株を候補から外し、Lib03-142D、Lib06-288D、Lib08-364D の 3 株を第 2 ラウンドに進めた。

2.2.4.7 不均衡変異導入技術を利用した改変細胞の取得（第 3 ラウンド後）

第 2 ラウンド、第 3 ラウンドの変異導入は第 1 ラウンドと同様の操作を繰り返した。第 3 ラウンドの変異導入後、変異ライブラリーから約 1800 株に関して、その生産性を評価し、その中から 108 株を選抜した。Table 5 に 125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養における生産性上位 32 株の結果を示した。

Table 5 Fed Batch の結果（第3ラウンド後）

Strains	Titer (mg/L)	
	Day 14	Day 17
BE01	2093	2285
BE02	1696	1636
BF02	1496	1587
BF03	1517	1797
CJ01	1027	1305
AD01	938	1048
BE06	1290	Not Tested
BE08	1341	Not Tested
BF06	1517	Not Tested
CI01	1151	Not Tested
CK01	1939	2200
CK02	1283	1561
CK03	2108	2367
CK04	1884	2078
CK05	1032	1217
CK06	1499	1586
CL01	1258	1483
CL02	1594	1498
CL03	1321	1433
CL04	1379	1485
CL05	1262	1460
CL06	1311	1463
MX01	1597	1913
MX02	2386	2605
MX04	1903	2133
MX06	1781	1918
MX08	1976	2101
MX09	1758	1841
MX12	1786	1594
MX16	1875	1886
MX22	1605	1885
MX41	1581	1758

培養 14 日目で 2000 mg/L 以上の生産性を示す MX02 株、CK03 株、BE01 株が取得された。これら 3 株は、培養 17 日目に、それぞれ 2605、2367、2285 mg/L の生産性を示した。また、培養 17 日目では、上記 3 株に加え、CK01 株、CK04 株、MX04 株も 2000 mg/L 以上の生産性を示した。

2.2.5 まとめ

本検討では、宿主細胞 CHO-O1 PDL38 の抗体生産能向上を目的に抗体生産株#544 に対し、不均衡変異導入法を適用し細胞育種を行った。変異導入は、①不均衡変異導入による変異ライブラリーの構築、②高生産細胞の選抜、③再導入評価を 1 ラウンドとした計 3 ラウンドを実施した。その結果、3 ラウンドの変異導入後、親株である#544 の生産性（約 1100 mg/L）に比べ、2.2-2.5 倍向上した育種株、MX02 株（2605 mg/L）、CK03 株（2367 mg/L）、BE01 株（2285 mg/L）が取得された。Figure 15 に親株#544 と各ラウンドで取得した育種株の生産性向上の推移を示した。

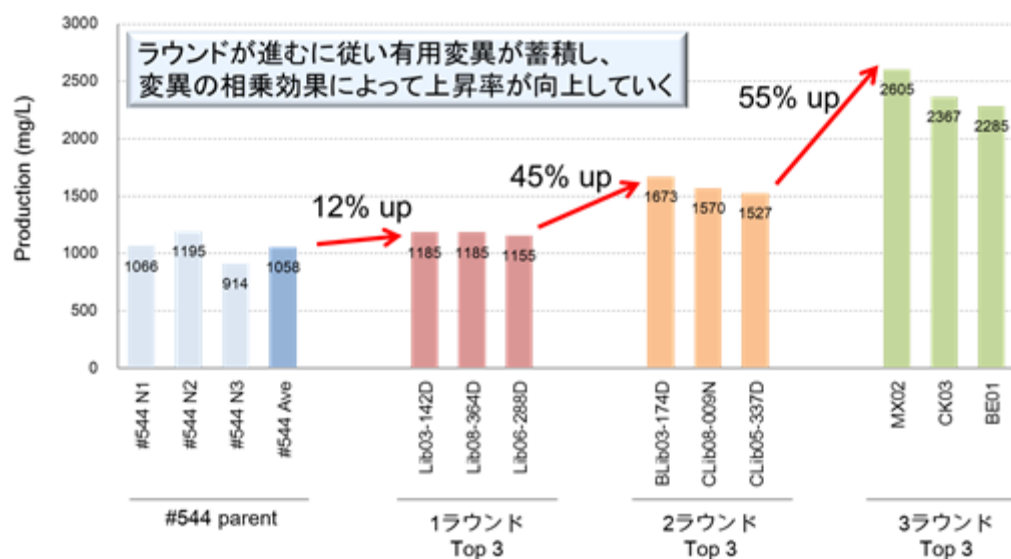


Figure 15 各ラウンドの上位 3 株の生産性の推移

親株#544 の 3 回の Fed Batch 培養における抗体生産性は平均で 1058 mg/L であった。第 1 ラウンドで得られた Lib03-142D 株の生産性は 1185 mg/L であり、親株よりも 12% 向上していた。第 2 ラウンドでは、BLib03-174D 株の生産性が 1673 mg/L であり、Lib03-142D 株に比べて 45% 向上していた。さらに第 3 ラウンドでは、MX02 株の生産性が 2605 mg/L となり、BLib03-174D 株と比べて、55% 向上していた。このように、スクリーニングラウンドを繰り返すことによる生産性の増大は、不均衡変異導入法による育種によって、有用な変異が蓄積

し、各変異の相乗効果によることが推察された。これまでに生産性向上を目指した様々な宿主細胞の改変が報告されているが、親株の生産性が 1 g/L 以上で、2.2-2.5 倍も向上した例はない。Bruno らは、抗アポトーシス遺伝子である *E1B-19K* 及び *AVEN* を過剰発現させることで培養後期の細胞密度及び生存率が改善し、生産性が 40-50% 向上することを報告している(46)。Nicole らは、シャペロン分子である PDI (protein disulfide isomerase) を過剰発現させることで分泌経路の強化し、比生産速度が 40% 向上することを報告している(71)。また、Kegin らは、LDH-A (乳酸脱水素酵素) の遺伝子を破壊することで生産性が 2.6 倍向上することを報告しているが、その親株の生産性は 60 mg/L と非常に低い値であった(66)。また、宿主細胞のゲノム DNA 全体に対して変異を導入する方法として、紫外線や化学変異原などによる突然変異導入方法が知られているが、これらの方法で CHO 細胞の生産性を向上させた例は報告されてない。これは、これらの突然変異導入方法により遅発性細胞死が引き起こされることに起因している(84)。このことは、不均衡変異導入法が抗体生産細胞育種において非常に優れた技術であることを示している。

以上より、不均衡変異導入法による抗体生産細胞育種の結果、より高生産化することに成功した。

今後は、育種によって選抜した高生産能を獲得した宿主細胞への抗体遺伝子の再導入評価と共に、親株#544 及び各ラウンドで取得した育種過程株のゲノム変異解析によって生産性向上に関連することが期待される原因遺伝子の探索とその機能解析、また、さらなる変異導入による育種を継続していく予定である。

第3章. 抗体遺伝子導入方法の検討

3.1 *hprt* 遺伝子座を標的とした抗体遺伝子導入方法

3.1.1 要旨

本章では、TOTO 株式会社の *hprt* 遺伝子座への部位特異的相同組換え技術を利用した抗体生産株の構築及びその生産性、継代安定性について評価した。その結果、生産性は 30~50 mg/L (DNA エlement 有り~180 mg/L) を示し、株間の性状に顕著な差異は認められなかった。一方で、DNA エlement と共に抗体遺伝子を導入した場合には、株間で差異が認められた。また、得られた生産株の生産性は 4 週間の継代培養においても安定に維持された。

3.1.2 背景

一般的な抗体生産株の構築では、宿主細胞を抗体遺伝子と選択マーカーを保持するベクターによって形質転換した場合、導入した抗体遺伝子が宿主細胞のゲノム DNA にランダムに取り込まれるため、挿入位置や抗体遺伝子のコピー数を制御することが困難である。抗体遺伝子の発現量は、発現ベクターの性能だけではなく、挿入された染色体位置における転写効率やコピー数に大きく依存するため、株間でバラつきが生じることが知られている(85,86)。また、染色体挿入位置によって、導入した抗体遺伝子の転写活性が低下する（継代安定性の低下）ことも知られている(85,86)。不安定な生産株とは、継代培養による抗体遺伝子の脱落（コピー数の低下）や抗体遺伝子のサイレンシングによって生産性が低下するものを指している(87)。そのため、様々な抗体遺伝子の発現量や導入遺伝子の発現安定性を示す細胞集団の中から、導入遺伝子が高発現かつ安定に保持され、さらに適切な品質の抗体を生産している抗体生産株を取得するためには、多大な労力と時間を要する。一方、導入遺伝子の発現を制御するプロモーターからの転写活性が安定的に高い領域、いわゆる Hot Spot に抗体遺伝子を導入することを可能にする部位特異的相同組換え技術は、目的とする細胞を比較的労力をかけずに取得することが可能になるであろう(88-92)。

そこで本研究では、部位特異的相同組換えによる遺伝子導入方法の評価の一貫として TOTO 株式会社（以下 TOTO 社）の *hprt* 遺伝子座への部位特異的相同組換え技術を利用した抗体生産細胞の構築及びその生産性、継代安定性を評価した。*hprt* 遺伝子は、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼをコードするハウスキーピング遺伝子であり、CHO 細胞には 1 遺伝子のみ存在し（対立遺伝子がない）、また、部位特異的相同組換えにおける選択マーカーとして利用できることから部位特異的相同組換えに適した染色体上の遺伝子導入領域である。この方法で取得される抗体生産株は、ハウスキーピング遺伝子（*hprt*）領域への

導入によって、長期間培養においても発現が安定し、株間の発現量にばらつきが生じないことが期待され、高生産株スクリーニングに要する労力や時間の軽減が期待できる。

3.1.3 実験材料及び実験方法

3.1.3.1 宿主細胞

宿主細胞は、CHO-K1 ATCC[®] CCL-61[™]を無血清・浮遊馴化して構築した CHO-O1 PDL38 を用いた。

3.1.3.2 抗体発現ベクター

基本抗体発現ベクターとして、pDSLH4.1 を使用した。CHO *hprt* 組換えベクター、CHO LoxP ベクターは、Figure 16 に示すとおり、エキソン 3 を中心として上流 2.5 kb をホモロジーアーム 1、下流 2.5 kb をホモロジーアーム 2 を含んでいる (TOTO 社より供与)。CHO De-LoxP ベクターは、抗体発現ベクター pDSLH4.1 から DNA エLEMENT を切り出し、CHO LoxP ベクターに挿入して構築した。先述の 2 種の *hprt* 組換えベクター (CHO De-LoxP ベクターおよび CHO LoxP ベクター) は、開始コドンを含んだ puromycin 耐性遺伝子が導入されており、これらのベクターが染色体上に組み込まれた場合、puromycin 耐性は獲得できない。hEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体を有する組込みベクターの Cre 組換え酵素による導入によって hEF1 プロモーターが puromycin 耐性遺伝子上流に導入された場合のみ、LoxP-puroR 融合タンパクが発現する。pEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体を有する組込みベクターは、hEF1P+LoxG1C2 ベクター (TOTO 社より供与) に、pDSLH4.1 から切り出したプロモーター-抗体重鎖、プロモーター-抗体軽鎖を段階的に挿入して構築した。

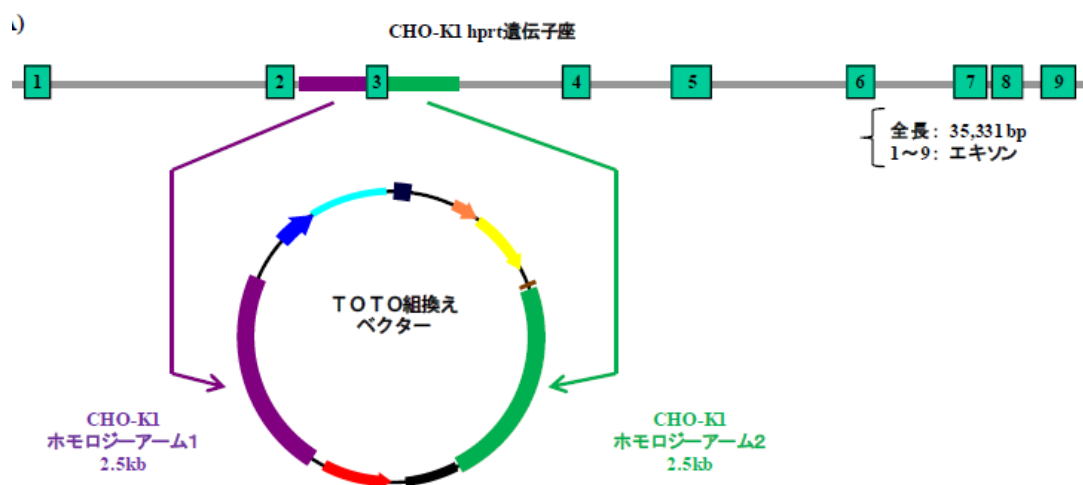


Figure 16 CHO LoxP ベクターのホモロジーアームと *hprt* 遺伝子座の概略図

3.1.3.3 選択薬剤（puromycin、6TG、G418）と最小生育阻止濃度の検討

宿主細胞 CHO-O1 PDL38 を AMEM 培地にて接着培養し、数回継代後に実験に用いた。CHO-O1 PDL38 をトリプシンで剥離し、AMEM 培地で 2×10^5 cells/mL に調製後、24 well plate に 0.5 mL ずつ播種した。次に、AMEM 培地で段階希釈した選択薬剤（puromycin、6TG、G418）を 0.5 mL ずつ各ウェルに分注した。37°C、5% CO₂ で 3 日間培養後、各ウェルの細胞をトリプシンで剥離してサイトレコン（GE ヘルスケア）で細胞密度を計測し、最小生育阻止濃度を決定した。

3.1.3.4 PDL38 の *hprt* 遺伝子座ホモロジーアーム対応配列の確認

MagExtractor を用いて CHO-O1 PDL38 のゲノム DNA を抽出し、CHA1-seq-s10/PciNru-CHA2-200-r2 プライマーセットでホモロジーアーム 1（2.5 kb）を、SseNru-CHA1-200-s/CHA2-seq-a4 プライマーセットでホモロジーアーム 2（2.5 kb）を PCR 法によって増幅した Figure 17。増幅産物は、下記のプライマーを用いてダイレクトシーケンシングによって増幅領域の塩基配列を確認した。

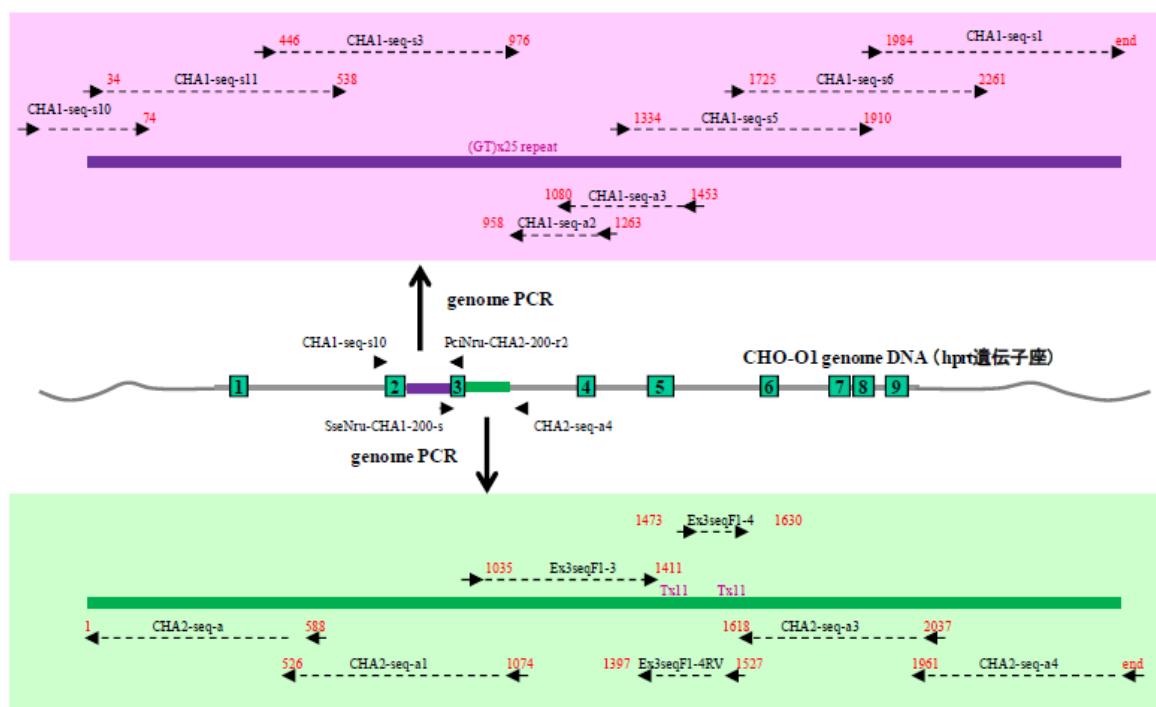


Figure 17 CHO-O1 PDL38 の *hprt* 遺伝子座ホモロジーアーム領域の塩基配列解析概略

図

CHA1-seq-s1	: 5' -CTCAGCCTCCAGAGTGCTAG-3'
CHA1-seq-s3	: 5' -CATTGGGAGCTACTGTGTGG-3'
CHA1-seq-s5	: 5' -GAGGATGACCTGAAGTTCTG-3'
CHA1-seq-s6	: 5' -ACTACCAGTGGTATGTGAGTTC-3'
CHA1-seq-s10	: 5' -GCGTAGACTAGTCTCTGATG-3'
CHA1-seq-s11	: 5' -GACACATGCAGACAGAACAG-3'
CHA1-seq-a2	: 5' -CTATGCCTAGTATGCACAGG-3'
CHA1-seq-a3	: 5' -CCTAAAGCTGAGCAAGTGCC-3'
PciNru-CHA2-200-r2	: 5' -TTACATGTTTCGCGATTTCAGCACTCAGGAGTCAGAG-3'
CHA2-seq-a	: 5' -ACTCCCAGAATTGTTGGGAGGC-3'
CHA2-seq-a1	: 5' -CCAGAGAAATTATTTGCCACCAGC-3'
CHA2-seq-a3	: 5' -GCTATTCTTGCAGAGTACCC-3'
CHA2-seq-a4	: 5' -GTTTGCTAACACCCCTTCTC-3'
Ex3seqF1-3	: 5' -CGTGGTAGTTCACAGTTGTC-3'
Ex3seqF1-4	: 5' -TCTCTTTTTTTTTTTTGAACTCTATG-3'
Ex3seqF1-4RV	: 5' -TAAGTTTCTCTATAATATCCTGC-3'
SseNru-CHA1-200-s	: 5' -TTCCTGCAGGTCGCGATGGAATCTTCTATTTCCTGATTT-3'

3.1.3.5 CHO-O1 PDL38 に存在する *hprt* 遺伝子数の確認

CHO-O1 PDL38 を 96 well plate に 500 cells/100 μ L/well の条件で播種した後、培養した。顕微鏡下、well の底面に対し、80~90%コンフルエントに達したのを確認した後（3日後）、AMEM+6TG 培地に置換してさらに2週間培養を継続した。その後、顕微鏡下、生細胞コロニーの存在するウェル数を計測することによって評価した。

3.1.3.6 抗体遺伝子を発現する *hprt* 部位特異的組換えベクターの構築及び *hprt* 組換え細胞の構築

抗体発現を促進する DNA エLEMENTの有無、2種類の *hprt* 組換え体を作製した。これまでの検討結果から、相同組換え体取得頻度がベクター長に相関して低下することが判明しており、取り扱いが容易なベクター長は約 20kb であった（Data not shown）。全長 9kb の pUC ベクターを基本とした *hprt* 組換えベクターに搭載できる挿入遺伝子断片長は 11kb であり、DNA エLEMENT（8.5kb）と抗体遺伝子カセットを導入する場合、全長は 20kb を優に越える。そこで、DNA エLEMENTとの共導入においては、DNA エLEMENTを *LoxP* とともに *hprt* 遺

伝子座に組み込み、続いて、抗体遺伝子ベクターを Cre 組換え酵素による組換え反応によって導入した。一方で、DNA エlementとの共導入しない場合は、CHO LoxP ベクターを *hprt* 遺伝子座に組み込み、続いて、抗体遺伝子ベクターを Cre 組換え酵素による組換え反応によって導入した。

DNA エlementを有する *hprt* 組換え体は、電気穿孔法によって CHO-O1 PDL38 に *hprt* 組換えベクター-CHO De-LoxP ベクターを導入し、G418/6TG 選択によって取得した陽性細胞に対し、pEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体を含むベクターを導入し、puromycin 選択によって陽性細胞を取得した。DNA エlementを含まない *hprt* 組換え体も同様に *hprt* 組換えベクター-CHO LoxP ベクターと pEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体を含むベクターを CHO-O1 PDL38 に導入し、陽性細胞を取得した。

3.1.3.7 *hprt* 組換え体の無血清・浮遊馴化

hprt 組換え体は血清含有培地にて、接着状態で作製したことから、再度、無血清・浮遊馴化した。取得した細胞は、トリプシンで剥離した後、遠心して CD CHO 培地で洗浄し、30 mL の培地中に 3.0×10^5 cells/mL の細胞密度で 125 mL 容三角フラスコに移し、37°C、8% CO₂、128 rpm で培養した。細胞密度が 1.0×10^6 cells/mL を超えるまで培養を継続し、 $1.0 \sim 2.0 \times 10^5$ cells/mL に希釈継代して培養を継続した。3 日間で安定して 1.0×10^6 cells/mL を超える状態に達した時点で馴化を終了した。

3.1.3.8 *hprt* 組換え抗体生産株の Batch 培養及び継代安定性評価

hprt 組換え抗体生産株 (DNA エlement有無、2 種類) を CD CHO 培地で 2.0×10^5 cells/mL に調製し、125 mL 容三角フラスコで 8 日間 Batch 培養した。毎日サンプリングし、細胞密度と抗体濃度 (ELISA) を測定した。また、CD CHO 培地での継代維持を 4 週間行った後、同様に Batch 培養を行い、継代安定性を確認した。

3.1.3.9 *hprt* 組換え抗体生産株の Fed Batch 培養及び品質評価

hprt 組換え抗体生産株 (DNA エlementの共導入、非導入の 2 種類) を生産培地で初発細胞密度を 3.0×10^5 cells/mL になるように調製し、30 mL の生産培地を含む 125 mL 容三角フラスコを用いて、37°C、5%CO₂、120 rpm の条件下、14 日間の Fed Batch 培養を行った。培養 7 日目、10 日目、14 日目の培養液について、細胞密度と抗体濃度 (ProteinA-HPLC) を測定した。また、生産された抗体の N 型糖鎖プロファイルを BlotGlyco (住友ベークライト) によって解析した。

3.1.4 結果

3.1.4.1 CHO-O1 PDL38 の特性解析

3.1.4.1.1 CHO-O1 PDL38 の各種薬剤に対する最小生育阻止濃度の検討

スクリーニング工程は、血清を添加した付着培養の下、実施されるため、同一条件下における CHO-O1 PDL38 に対する各種選択薬剤濃度を検討した。

その結果、puromycin は 10 $\mu\text{g/mL}$ 、6TG は 5 μM 、G418 は 0.4 mg/mL で細胞の死滅が確認された。この中で、G418 は殺細胞効果が弱かったため、3 日間の培養後、さらに同一濃度の G418 を含む培地で 10 倍希釈した後、24 well plate の 3 日後の細胞数で評価した。これらの検討結果より、確実に死滅させることができる濃度としてそれぞれの薬剤に対して形質転換細胞を選択する濃度を puromycin は 20 $\mu\text{g/mL}$ 、6TG は 20 μM 、G418 は 0.5 mg/mL と決定した。

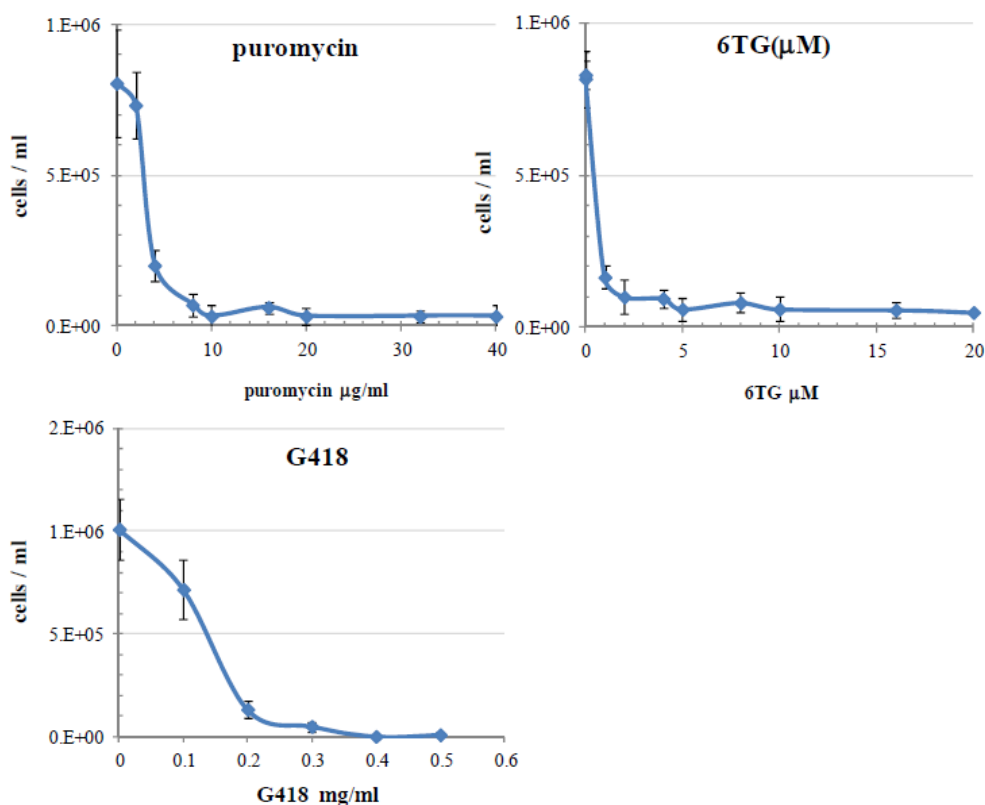


Figure 18 CHO-O1 PDL38 の各種薬剤に対する最小生育阻止濃度

3.1.4.1.2 CHO-O1 PDL38 ゲノム DNA 上の *hprt* 遺伝子領域の塩基配列解析

hprt 遺伝子座を標的とした部位特異的相同組換えには、使用するベクター中に導入する *hprt* 遺伝子領域配列と宿主として使用する CHO-O1 PDL38 染色体の対応配列が同一である必要がある。そこで、CHO-O1 PDL38 のゲノム DNA の該当領域を PCR 法により増幅して塩基配列を解析した。その結果、CHO-O1 PDL38 の *hprt* 遺伝子座エキソン 3 周辺の配列は CHO-K1

(Genbank acc#AMDS00000000.1) と完全に一致していた。CHO-O1 PDL38 を宿主とした組換え反応には TOTO 社から供与された *hp*rt 組換えベクターの *hp*rt 遺伝子座エキソン 3 周辺配列が使用できることを確認した。

3.1.4.1.3 6TG (6-チオグアニン) 存在下の *hp*rt 組換え体の選択

動物細胞は、HPRT を欠損した場合に 6TG に抵抗性を示すことが知られている(93)。従って、CHO-O1 PDL38 から取得された *hp*rt 組換え体は、6TG の存在下、*hp*rt 遺伝子座を標的に遺伝子が挿入され、その機能を欠損した場合に、目的組換え細胞を選択することが可能である。しかしながら、染色体上に活性型 HPRT をコードする *hp*rt 遺伝子が複数存在した場合、1 コピーのみの組換えでは 6TG 耐性を示すことができないため、選択することができない。また、CHO 細胞の亜種である DG44 株、DXB11 株のように、*hp*rt 遺伝子の欠損が致死的な株についても現行のベクター系を使用することができない。この表現型は、 10^{-6} 程度の頻度で発生する 6TG 耐性変異株の自然誘発を確認することによって確認することができる。そこで CHO-O1 PDL38 の 6TG 耐性変異株の出現頻度を検討した。その結果、CHO-O1 PDL38 では 1.0×10^7 cells の細胞から 611 個の 6TG 耐性突然株が取得された。ある遺伝子座での突然変異頻度は一般的に 10^{-6} オーダーであり、仮に *hp*rt が 2 ヲ所存在した場合、2 ヲ所の *hp*rt 遺伝子両方に変異が生じる頻度は 10^{-12} となり、変異原なしで変異体を取得することはほぼ不可能となる。従って、CHO-O1 PDL38 から *hp*rt 変異株が取得できたことから、少なくとも活性 HPRT をコードする *hp*rt 遺伝子は一ヶ所と推定され、CHO-O1 PDL38 の *hp*rt 組換え体は 6TG 存在下で選択可能であると判断した。

3.1.4.2 *hp*rt 組換え株の作製

DNA エlement との共導入効果を検討するため、2 種類の *hp*rt 組換え体を作製した。CHO-O1 PDL38 に対して、*hp*rt 座への DNA エlement との共導入株を作製する場合は、CHO DE-LoxP ベクターを、*hp*rt 座へ抗体遺伝子のみを導入する場合は CHO LoxP ベクターを電気穿孔法によってそれぞれ導入し、G418 と 6TG の存在下で選択した。その結果、DNA エlement を共導入した場合は 12×10^6 cells から 12 個の陽性細胞が取得された。一方で、DNA エlement を導入しなかった場合は、 4×10^6 cells から 11 個の陽性細胞が取得された。取得した細胞に関しての genomic PCR 法によって、目的組換え細胞であることを確認した結果、前者は 6/10、後者は 6/8 が *hp*rt 座への目的相同組換え細胞であった。

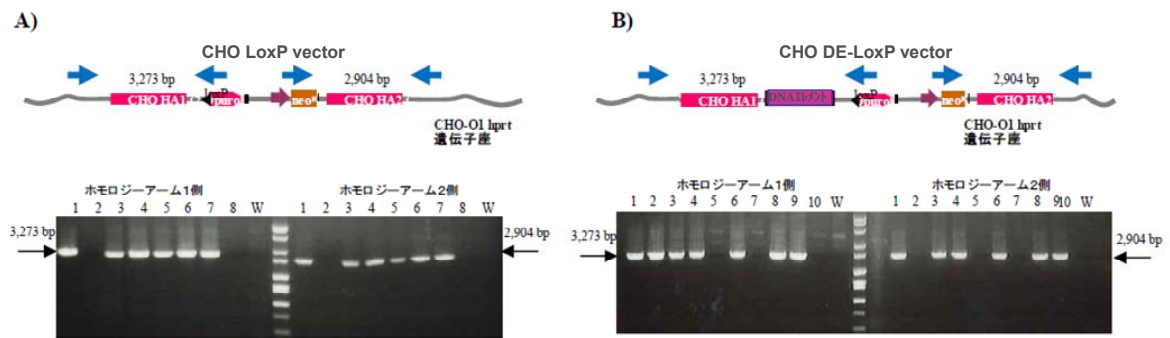


Figure 19 CHO-O1 PDL38 の *hprt* 遺伝子座への目的遺伝子の導入 (A : LoxP ベクター組込み後の推定 *hprt* 遺伝子座周辺領域の構造 (上段) と genomic PCR の結果 (下段)、B : DE-LoxP ベクター組込み後の推定 *hprt* 遺伝子座周辺領域の構造 (上段) と genomic PCR の結果 (下段))

それぞれの条件下で取得された 6 株について、Real-time PCR 法によってコピー数を定量した。その結果、解析した全ての変異株には、目的遺伝子が 1 コピーのみ組込まれた組換え体であることが確認された。任意の 1 株を選択し、次項の pEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体の Cre 組換え酵素反応による導入検討に供した。

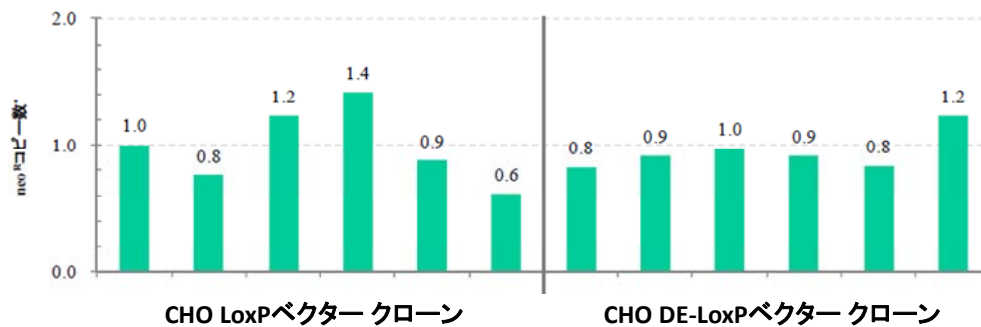


Figure 20 CHO-O1 PDL38 へ導入されたベクターのコピー数 (18S rDNA コピー数 N を Normalizer としたネオマイシン耐性遺伝子コピー数の定量)

作製した 2 種類の株に対し、それぞれ pEF1 プロモーターと抗体遺伝子発現構成体を含む LoxP 組込みベクターと Cre 組換え酵素発現ベクターを電気穿孔法によって共導入し、puromycin 選択によって陽性細胞を取得した。取得細胞に対する genomic PCR の結果、全株が目的とする Cre 組換え反応によって得られた組換え体であることが推察された。また、Cre 組換え酵素発現ベクターを検出する PCR 用プライマーセットによる増幅産物は検出されな

かったことから、導入した Cre 組換え酵素発現ベクターは、ゲノム DNA 中にランダムインテグレーションによって導入されていないことが確認された。

3.1.4.3 *hprt* 組換え株の無血清・浮遊馴化及び特性解析

3.1.4.3.1 *hprt* 組換え株の無血清・浮遊馴化

前項で取得した株から任意に 3 株を選抜し無血清・浮遊馴化を行った。その馴化の過程を Figure 21 に示す。

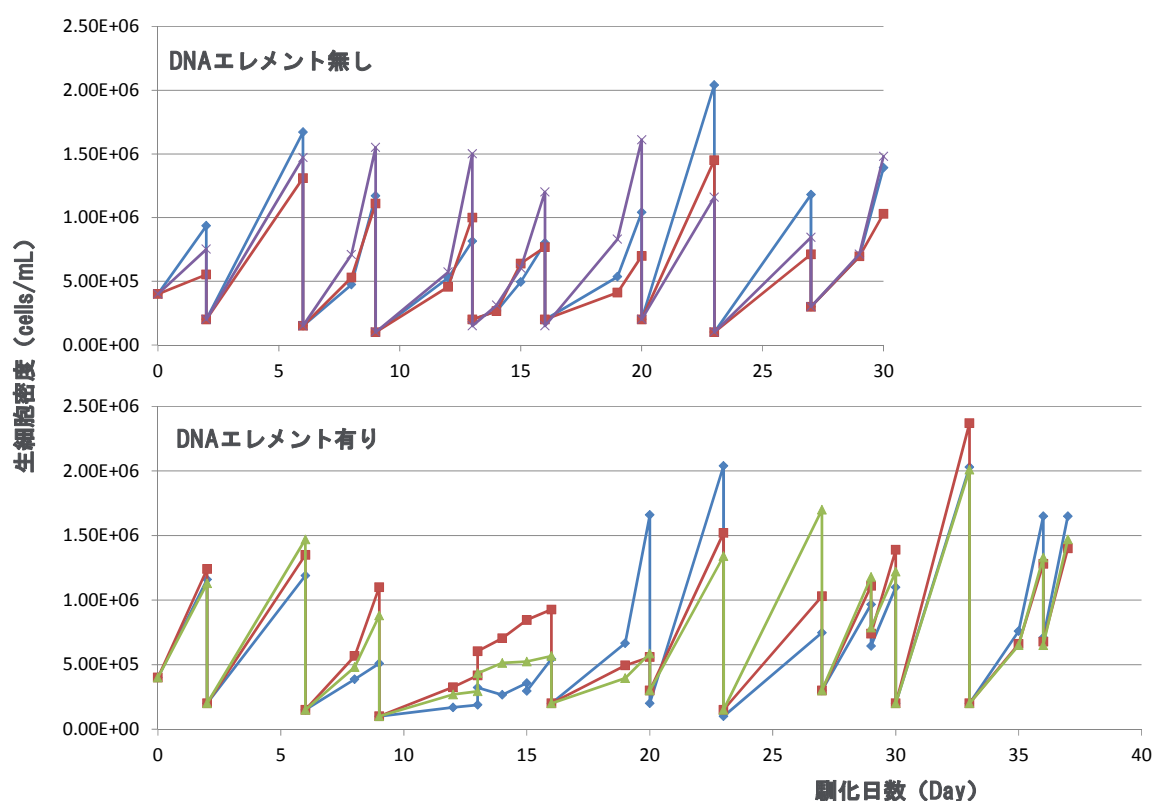


Figure 21 CHO-O1 PDL38 から得られた *hprt* 組換え株の無血清・浮遊馴化

DNA エlementを導入しなかった 3 株は、3 週間程度で無血清・浮遊馴化ができた。一方、DNA エlementを共導入した株ではいずれも 2 週間目から 1 週間ほど増殖が停滞し、その後回復して培養開始 4 週間目には無血清・浮遊培養条件下、安定して増殖が可能となった。DNA エlementの共導入株で認められた増殖の停滞は試験した 3 株全てにおいて認められたため、導入した DNA エlementが何らかの影響を与えていることが示唆される。

3.1.4.3.2 *hp*rt 組換え株の Batch 培養及び継代安定性評価

DNA エlementを導入しなかった 3 株は、同様な増殖特性（細胞密度）と同様な抗体生産性（約 20 mg/L）を示した。一方で、DNA エlementを共導入した場合は、増殖特性（細胞密度）には株間で差異はなかったが、抗体生産性は約 80、40、30 mg/L と大きく異なる値を示した（Figure 22）。

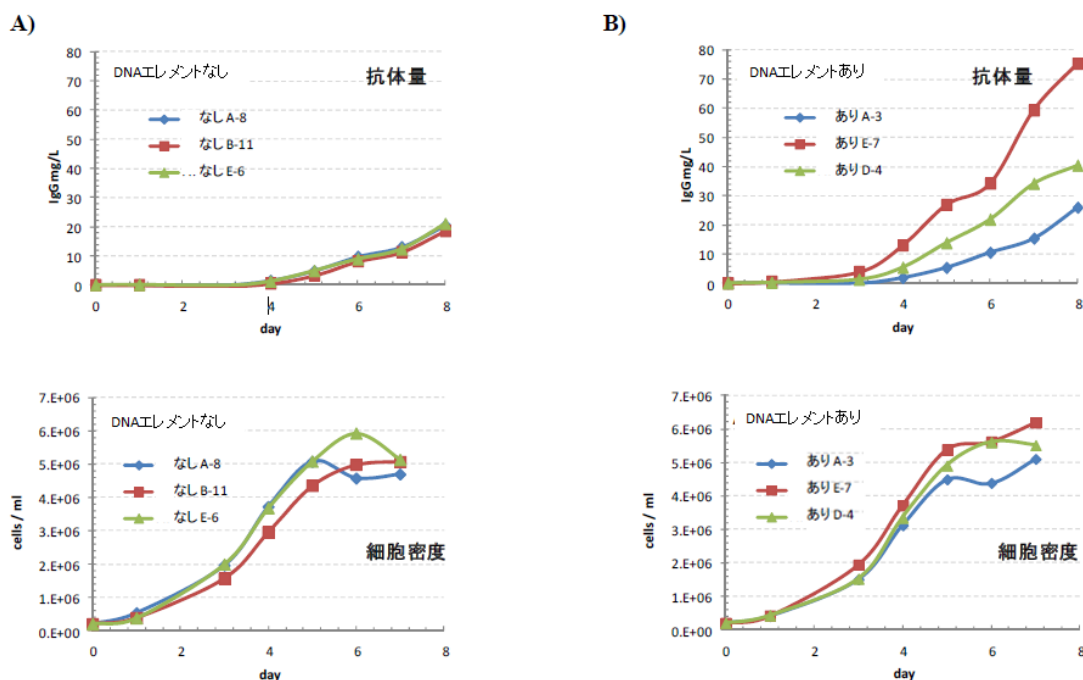


Figure 22 *hp*rt 組換え株の Batch 培養評価

上記試験した *hp*rt 遺伝子座での組換え株に関して、継代培養開始前と継代培養開始後 4 週間経過後の Batch 培養による抗体生産性を比較した（Figure 23）。全株ともほぼ同様な結果を示したことから、*hp*rt 遺伝子座を標的とした部位特異的遺伝子導入によってえられた組換え細胞は、遺伝的形質が安定に保持されることが推察された。

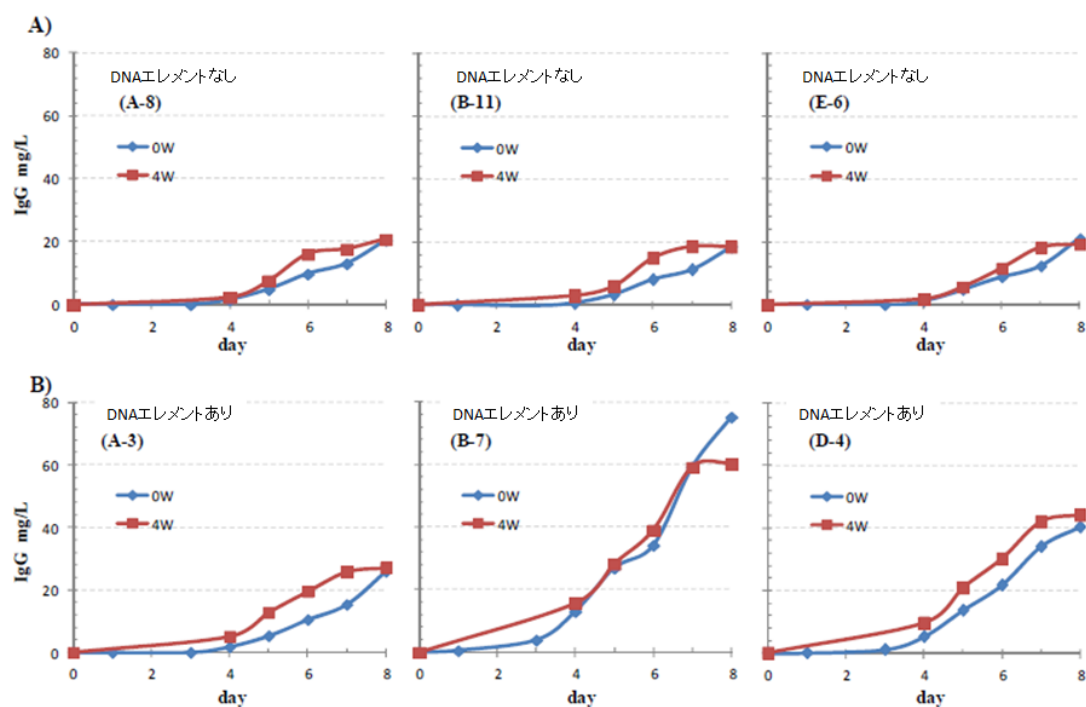


Figure 23 *hprt* 組換え株の抗体生産性の推移と安定性

3.1.4.3.3 *hprt* 組換え株の Fed Batch 培養評価

前項で評価した *hprt* 組換え株、6 株（DNA エLEMENT の共導入、非導入株各 3 株）について、125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養を実施した。各 3 株のうち 1 株については、DA1 培地（カスタム培地）の他、3 種類の培地（C/E 培地（CD-CHO/ExCell325）、CD FortiCHO 培地（Life technologies 社）、G13 培地（カスタム培地））を用いて検討した（Figure 24）。

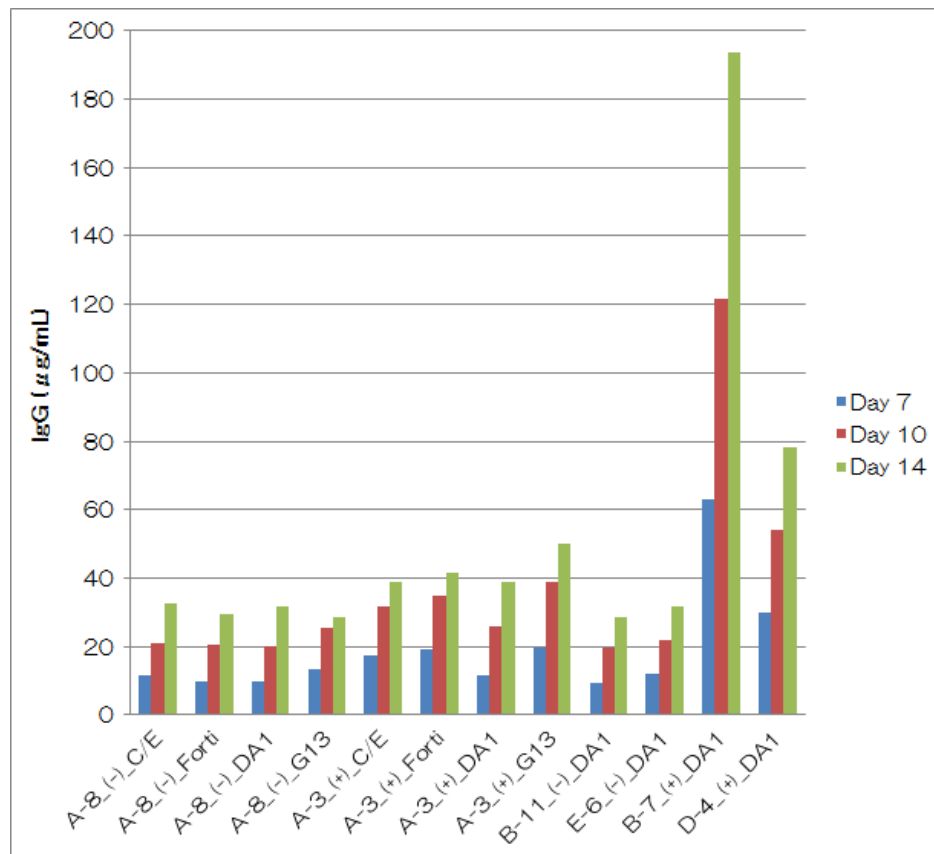


Figure 24 *hprt* 組換え株の Fed Batch 培養結果

Fed Batch の結果、DA1 培地で培養した DNA エlement 非導入株の抗体生産性は 32、29、32 mg/L を示し、DNA エlement 共導入株では 39、194、78 mg/L を示した。また、培地によってその生産性は大きく変化しなかった。得られた培養液から Protein A 精製によって生産された抗体を回収した後、N 型糖鎖プロファイルを解析した。その結果、糖鎖プロファイルに変化は認められなかった (data not shown)。

3.1.5 まとめ

Batch 培養の結果、試験した 3 株の DNA エlement 非導入株では、抗体生産性はそれぞれ約 20 mg/L を示した。一方、DNA エlement 共導入株では株間で増殖能に大きな差は認められなかったが、それぞれの抗体生産性は約 80、40、30 mg/L と異なった。最も低い生産性を示した株でも DNA エlement 非導入株よりも高い生産性を示しており、最も高い生産性を示した株では 3 倍以上の高い生産性を示した。また、Fed Batch 培養においても Batch 培養の結果と同様、DNA エlement 非導入株より高い生産性であったが (194、78、39 mg/L)、株間で生産性は異なっていた。いずれの株も同一の遺伝子座に導入されているにも関わらず、

このように差異が生じたことは興味深い。*hprt* 遺伝子座において、DNA エLEMENTの共導入効果が認められたが、株間で大きく抗体の生産性に差異が生じていたことから、*hprt* 遺伝子座は部位特異的相同組換えの標的遺伝子座として利用することは可能であるが、さらに高生産細胞を構築するためにはさらなる改良が必要であると考えられる。抗体遺伝子導入領域としての *hprt* 遺伝子座は、他の遺伝子座を利用して構築された抗体生産細胞の生産性が 100～400 $\mu\text{g/mL}$ であることから(94,95)、有用であると判断できる。さらなる生産性の向上には、抗体遺伝子のコピー数を高めること必要であり、本技術と組換え酵素を用いた配列部位特異的逐次遺伝子導入法(96)を組み合わせることでさらなる生産性の向上が期待される。

3.2 マウス由来人工染色体 (Mouse artificial chromosome, MAC) ベクターを利用した抗体生産株の構築

3.2.1 要旨

本章では、鳥取大学大学院 医学系研究科 押村 光雄教授らが開発したマウス由来人工染色体 (Mouse artificial chromosome, MAC) ベクター技術を利用した抗体生産株の構築及びその生産性、継代安定性について評価した。その結果、生産性は 95~131 mg/L を示し、株間で大きな差異は認められなかった。また、その生産性は約 2 ヶ月間の継代培養後も約 70% の生産性を維持していた。

3.2.2 背景

一般的な抗体生産株の構築では、宿主細胞を抗体遺伝子と選択マーカーを保持するベクターによって形質転換した場合、導入した抗体遺伝子が宿主細胞のゲノム DNA にランダムに取り込まれるため、挿入位置や抗体遺伝子のコピー数を制御することが困難である。抗体遺伝子の発現量は、発現ベクターの性能だけではなく、挿入された染色体位置における転写効率やコピー数に大きく依存するため、株間でバラつきが生じることが知られている(85,86)。また、染色体挿入位置によって、導入した抗体遺伝子の転写活性が低下する（継代安定性の低下）ことも知られている(85,86)。不安定な生産株とは、継代培養による抗体遺伝子の脱落（コピー数の低下）や抗体遺伝子のサイレンシングによって生産性が低下するものを指している(87)。そのため、様々な抗体遺伝子の発現量や導入遺伝子の発現安定性を示す細胞集団の中から、導入遺伝子が高発現かつ安定に保持され、さらに適切な品質の抗体を生産している抗体生産株を取得するためには、多大な労力と時間を要する。前項で検討したように、部位特異的相同組換えによる抗体生産細胞の取得方法はその問題を解決する手法の一つである(88-92)。しかしながら、利用するプロモーターの転写活性が恒常的に安定かつ高い領域、いわゆる Hot Spot を見つけ出すのは困難であり、今後さらに優良なホットスポットの探索が必要であると考えられる。

この問題に対処するひとつの方法として、鳥取大学大学院医学系研究科 押村光雄教授が開発し、株式会社 chromocenter によって提供されているマウス由来人工染色体 (MAC) ベクターの抗体生産系への応用を試みた。本人工染色体ベクターは、マウス染色体から人工テロメア配列による相同組換えで内在性の遺伝子領域を除去し、LoxP 配列を導入して作製されたもので、染色体としての性質を維持していることから、細胞分裂時に正常に娘細胞へ分配され、遺伝子発現ベクターとして利用することができる。さらに、MAC は、一般的なベクターとは異なり、搭載できる遺伝子の長さに制限がないため、目的遺伝子の多コピー化やシャペロ

ンなどのタンパク質分泌を促進させるような複数の遺伝子群も同一ベクター上に搭載することが理論上可能である。同様の技術を利用して抗体を発現させた例は既に報告されているが(21,97,98)、本技術を利用して抗体分子の発現に応用した例はない(20,21)。また、細胞構築は宿主細胞と発現ベクター、さらにその組合せが極めて重要である。そこで、本研究では、我々が開発した CHO-O1 PDL38 を宿主として、抗体発現ベクターpDSLH4.1 に本技術を組合せて抗体生産細胞を構築し、その生産性や継代安定性への影響を評価した。

3.2.3 実験材料及び実験方法

3.2.3.1 MAC 改変ベクター X3.1-LcHc

抗体の軽鎖、重鎖それぞれの遺伝子に対して、サイレンシング抑制機能を有するインスレーターHS4 を配置した MAC 改変ベクターを構築した (Figure 25)。

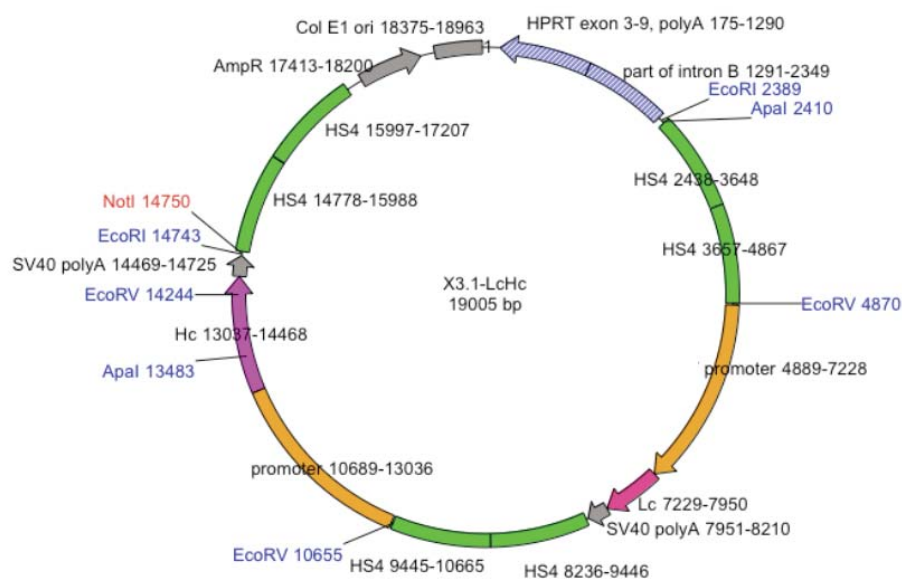


Figure 25 MAC 改変ベクター X3.1-LcHc の構造

3.2.3.2 MAC への目的遺伝子搭載

MAC を保有するマウス A9 細胞に、MAC 改変ベクター X3.1-LcHc と Cre 発現プラスミドを導入し、Cre-*LoxP* 組換えにより、抗体遺伝子を含む X3.1-LcHc を MAC に導入した。HAT 選択培養（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）にて陽性細胞を取得した。遺伝子導入のフローは Figure 27 に示した。

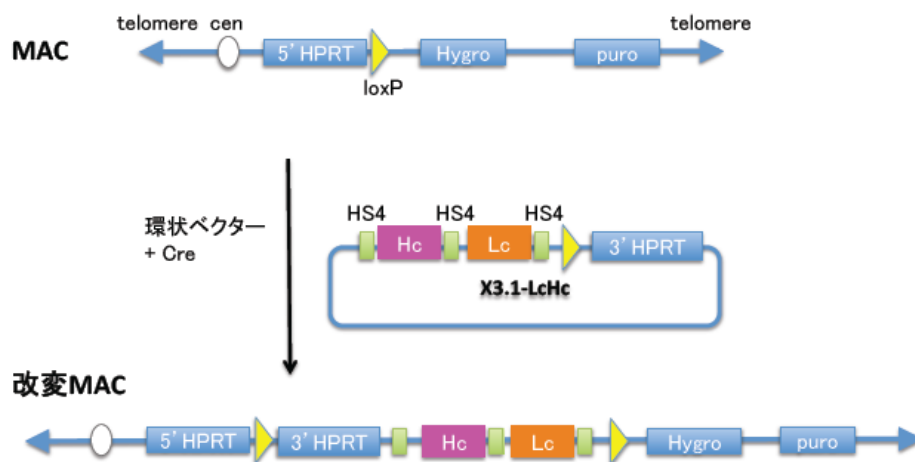


Figure 26 MAC への目的遺伝子搭載フロー

3.2.3.3 染色体標本作製

対数増殖期の細胞の培養液にコルセミド（紡錘糸形成阻害剤）を添加し、数時間培養した。培養液を遠心分離後、上清を除去して細胞を回収した。0.075M KCL 溶液を加えて細胞を懸濁し、細胞の低張処理を行った。カルノア溶液を加えて攪拌、遠心を三度繰り返すことによって細胞を洗浄した後、カルノア溶液の細胞懸濁液をスライドガラス上に垂らし、乾燥させて染色体標本作製した。

3.2.3.4 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析

プローブ DNA には、導入遺伝子検出用に X3.1-LcHc を、MAC 検出用に mouse minor satellite DNA を使用し、ニクトランスレーションキット（Roche Applied Science）で、それぞれビオチンおよびジゴキシンゲニン標識を行った。あらかじめ硬化しておいた染色体標本を 74℃ の 70%ホルムアミド/2×SSC 溶液中で変性させ、-20℃ の 70%EtOH で急冷脱水した。100%EtOH でさらに脱水した後、風乾させた。変性済みのプローブ溶液とハイブリダイゼーション溶液の混合液を染色体標本にのせ、37℃で一晩、ハイブリダイゼーションさせた。翌日、標本を洗浄した後、ローダミン標識抗ジゴキシンゲニン抗体とアビジン FITC を含む溶液を標本にのせ、37℃で 60 分間反応させた。標本を洗浄した後、ビオチン化抗アビジンを含む溶液を標本に載せ 37℃で 60 分間反応させた。洗浄後、FITC のシグナルを強めるため、再びアビジン FITC を含む溶液を標本にのせ、37℃で 60 分間反応させた。標本を洗浄した後、色素 DAPI 入りの封入剤で封入した。蛍光シグナルは蛍光顕微鏡で観察した。

3.2.3.5 微小核細胞融合法による染色体移入

微小核細胞融合法(MMCT; Microcell Mediated Chromosome Transfer)は、特定の染色体を一本、あるいはその一部を完全な状態で遺伝子導入することが可能であり、ヒト単一染色体ライブラリーの作製と利用や、数 Mbp にも及ぶ巨大な遺伝子や遺伝子クラスターの導入を行う技術として開発が進んでいる(99)。以下、目的遺伝子搭載 MAC 保有 A9 細胞（ドナー細胞）から、CHO-O1 PDL38（レシピエント細胞）への微小核細胞融合法について記す。

ドナー細胞である A9 細胞を培養フラスコへ播種し、フラスコ底面の 90%コンフルエントまで培養した。この細胞をコルセミド含有培地でさらに 48 時間培養した（微小核形成）。アクチン重合阻害剤である、サイトカラシン B を含む培地で培養フラスコを満たし、高速遠心により微小核細胞を回収した。回収した微小核細胞を径 8, 5, 3 マイクロメートルのフィルターで順次濾過し、微小核細胞を精製した。精製した微小核細胞を Phytohemagglutinin

(PHA-P) 溶液に懸濁した。前日より Poly-L-lysine(PLL)でコートしておいた 6 well plate へ CHO-O1 PDL38 を播種し、遠心により底面に CHO-O1 PDL38 を隙間なく接着させた。微小核細胞の懸濁液を CHO-O1 PDL38 に静かに重層し、遠心して微小核細胞と CHO-O1 PDL38 を密着させた。ポリエチレングリコールによる細胞融合法により、微小核細胞中の目的遺伝子搭載 MAC を CHO-O1 PDL38 へ導入した。96 well plate に播種し、翌日より Hygromycin B で選択することで、目的遺伝子搭載 MAC が導入された細胞を取得した。

3.2.3.6 Fed Batch 培養

目的遺伝子を搭載した MAC 保有細胞（CHO-O1 PDL38）を生産培地で 3.0×10^5 cells/mL に調製し、30 mL の培地を仕込んだ 125 mL 容三角フラスコによって、37°C、5% CO₂、120 rpm の条件下、14 日間の Fed Batch 培養を行った。培養 7 日目、10 日目、14 日目の培養液について、細胞密度と抗体濃度（ProteinA-HPLC）を測定した。

3.2.4 結果

3.2.4.1 目的遺伝子搭載 MAC 保有細胞（A9 細胞）の取得

MAC を保有するマウス A9 細胞に、MAC 改変ベクター X3.1-LcHc と Cre 発現プラスミドを導入し、Cre-*LoxP* 組換えにより、抗体遺伝子を含む X3.1-LcHc を MAC に導入し、HAT 選択培養（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）にて選択し、陽性細胞を 17 株取得した。取得した株について、目的遺伝子及びその発現を genomic PCR と RT-PCR にて評価した。Figure 27 及び Figure 28 に、評価した PCR 領域を示す。

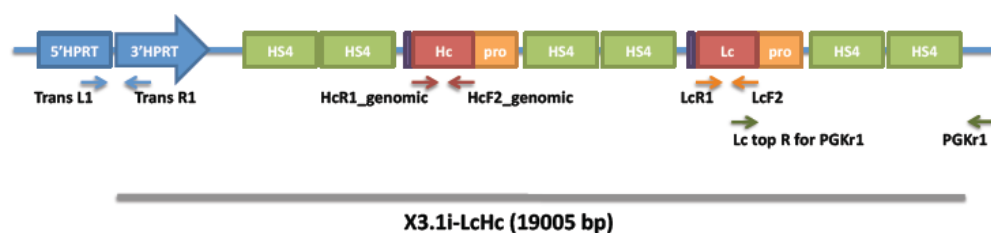


Figure 27 genomic PCR の増幅領域

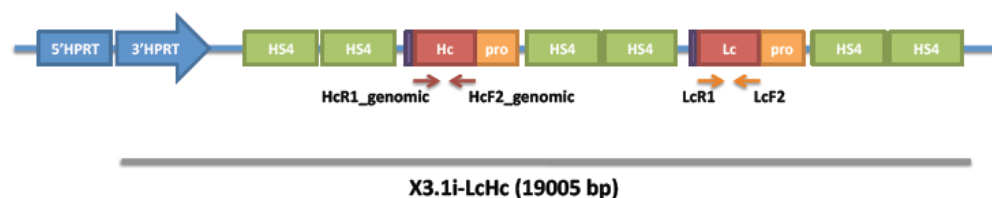


Figure 28 Real-time-PCR の増幅領域

genomic PCR の結果を Table 6 に示す。この結果、17 株中 15 株が目的遺伝子を有していた。

Table 6 目的遺伝子導入細胞（A9）の genomic PCR の結果

A9 LH # 22/M2 clones	genomic PCR				
	TRANS L1/ R1	Lc top R/ PGKr1	Lc F2/ Lc R1	Hc F2_genomic/ Hc R1_genomic	判定
# 1	○	×	—	—	×
# 2	○	○	○	○	○
# 3	○	○	○	○	○
# 4	○	○	○	○	○
# 5	○	○	○	○	○
# 6	○	○	○	○	○
# 7	○	○	○	○	○
# 8	○	○	○	○	○
# 9	○	○	○	○	○
# 10	○	○	○	○	○
# 11	○	○	○	○	○
# 12	○	○	○	○	○
# 13	○	○	○	○	○
# 14	○	○	○	○	○
# 15	○	○	○	○	○
# 16	○	×	—	—	×
# 17	○	○	○	○	○

次に、genomic PCR で陽性だった 15 株について RT-PCR を実施した。結果を Table 7 に示す。その結果、15 株中 13 株に目的遺伝子の発現を確認した（2 株はゲノム DNA の混入が認められた）。

Table 7 目的遺伝子導入細胞（A9）の RT-PCR の結果

A9 LH # 22/M2 clones	RT-PCR			
	GAPDH	Lc F2/ Lc R1	Hc F2_genomic/ Hc R1_genomic	判定
# 2	+	+	+	○
# 3	+	+	+	○
# 4	+	+	+	○
# 5	+	++	++	◎
# 6	+	++	++	◎
# 7	+	++	++	◎
# 8	+	++	++	◎
# 9	+	++	++	◎
# 10	+	++	++	◎
# 11	+	+	+	○
# 12	+	+	ゲノム DNA 混入	×
# 13	+	+	+	○
# 14	+	ゲノム DNA 混入	+	×
# 15	+	+	+	○
# 17	+	+	+	○

比較的目的遺伝子の発現量が高かった、6 株（#5、6、7、8、9、10）について 20 細胞の FISH 解析を行った。その結果を Table 8 に示す。転座の有無と FITC 陽性の MAC の割合から、#6、7、9 を MMCT に用いるドナー候補とした。

Table 8 目的遺伝子導入細胞（A9）の FISH 解析結果

A9 LH # 22/M2 clones	MAC×1 (FITC=0)	MAC×1 (FITC=1)	MAC×2 (FITC=0)	MAC×2 (FITC=1)	Total	備考
#5	6	1	10	3	20	
#6	2	17		1	20	
#7	4	3	1	12	20	
#8	1	2	2	14	20	MAC×0 (FITC=2) : 1 (転座の可能性)
#9	3		5	12	20	
#10	4		9	5	20	MAC×3 (FITC=0) : 1 MAC×3 (FITC=1) : 1

3.2.4.2 CHO-O1 PDL38 由来の目的遺伝子搭載 MAC 保有細胞の取得

目的遺伝子搭載 MAC 保有細胞 A9 細胞（#6、9）をドナー細胞とし、MMCT 法を用いてレシピエント細胞である CHO-O1 PDL38 に、目的遺伝子搭載 MAC を移入した。目的細胞は Hygromycin で選択し、陽性細胞を 15 株（#6 由来）、2 株（#9 由来）の計 17 株を取得した。取得した株について、目的遺伝子を genomic PCR 法により評価した（Table 9）。この結果、17 株中 13 株に目的遺伝子が導入されていることが確認された。これら 13 株の FISH 解析結果を Table 10 に示した。

Table 9 CHO-O1 PDL38 由来の目的遺伝子導入細胞の genomic PCR の結果

PDL38 LH/M2 clones	donor A9	selection Hyg (μg/mL)	maintain Hyg (μg/mL)	genomic PCR				
				TRANS L1/ R1	Lc top R/ PGKr1	Lc F2/ Lc R1	Hc F2_genomic/ Hc R1_genomic	判定
# 6-1	# 6	600	300	○	○	○	○	○
# 6-9	# 6	500	300	×	×	—	—	×
# 6-11	# 6	500	300	×	×	—	—	×
# 6-12	# 6	300	300	○	○	○	○	○
# 6-13	# 6	300	300	○	○	○	○	○
# 6-14	# 6	300	300	○	○	○	○	○
# 6-15	# 6	300	300	○	○	○	○	○
# 6-16	# 6	300	300	○	○	○	○	○
# 6-16-2	# 6	300	300	○	×	—	—	×
# 6-17	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 6-18	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 6-19	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 6-20	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 6-21	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 6-22	# 6	400	400	○	○	○	○	○
# 9-1	# 9	600	300	○	○	○	○	○
# 9-5	# 9	500	300	×	×	—	—	×

Table 10 CHO-O1 PDL38 由来の目的遺伝子導入細胞の FISH 解析結果

PDL38	2n						4n			
LH/M2 clones	MAC0 (F=0)	MAC1 (F=1)	MAC2 (F=1)	MAC2 (F=1)	MAC3 (F=3)	MAC4 (F=4)	MAC0 (F=0)	MAC1 (F=1)	MAC2 (F=2)	MAC4 (F=4)
# 6-1		18							2	
# 6-12		8		9			1		2	
# 6-13		6		6					2	6
# 6-14	2	6		5					5	2
# 6-15		16		2		1			1	
# 6-16		14		2					2	2
# 6-17		12		1	1			1	5	
# 6-18		15	1	1					3	
# 6-19		12		4					3	1
# 6-20	1	13		2					3	1
# 6-21		11		4					5	
# 6-22		15		3					2	
# 9-1		11		9						
PDL38	18						2			

FISH 解析の結果、ほとんどの株において、MAC を 1-2 本保持しており、全ての株で 90% の細胞に抗体遺伝子が搭載された MAC が保持されていた。

3.2.4.3 目的遺伝子を保持した MAC 保有細胞の Fed Batch 培養及び安定性評価

取得した 13 株の目的遺伝子を搭載した MAC 保有細胞（CHO-O1 PDL38）に関して、染色体の本数及び MAC 保有数から 4 つにグルーピングし（グループ 1：# 6-1、グループ 2：# 6-15、-16、-17、-18、-20、-22、グループ 3：# 6-19、-21、グループ 4：# 6-12、-13、-14、# 9-1）、各グループから 1～2 株を選抜し、計 5 株（# 6-1、-17、-15、-19、-12）を 2 種類の培地（DA1-DAFM3、G13-F13）を用いて、125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養にて抗体生産性を評価した（Figure 29）。

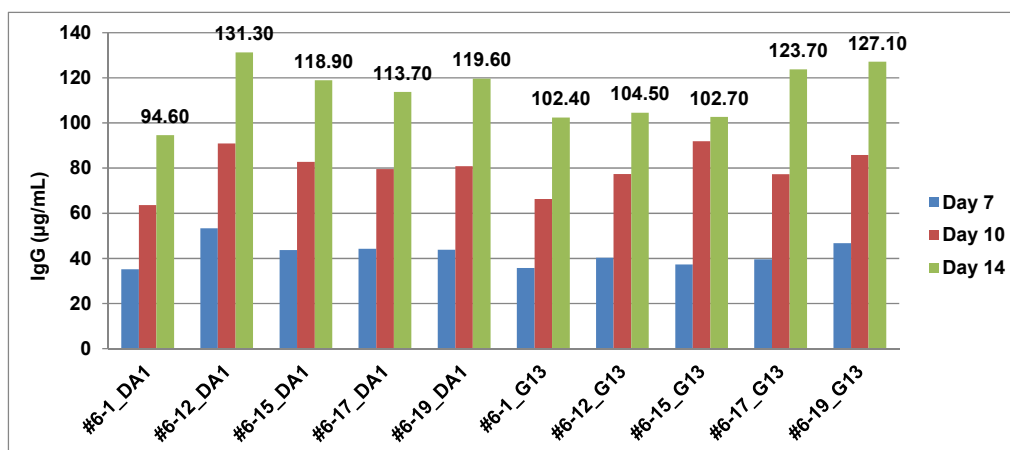


Figure 29 目的遺伝子を搭載した MAC 保有細胞（CHO-O1 PDL38）の Fed Batch の結果

この結果、95～131 mg/L の生産性を示し、株間、使用した培地間で差異は認められなかった。続いて、継代安定性評価として、各株を 15 継代（約 2 ヶ月間）培養を継続し、継代前後の細胞、それぞれ Passage 0、Passage 15 の生産性の差異を Fed Batch 培養にて評価した (Figure 30)。15 継代後の生産性は、継代前の生産性の 60～77%に低下した。

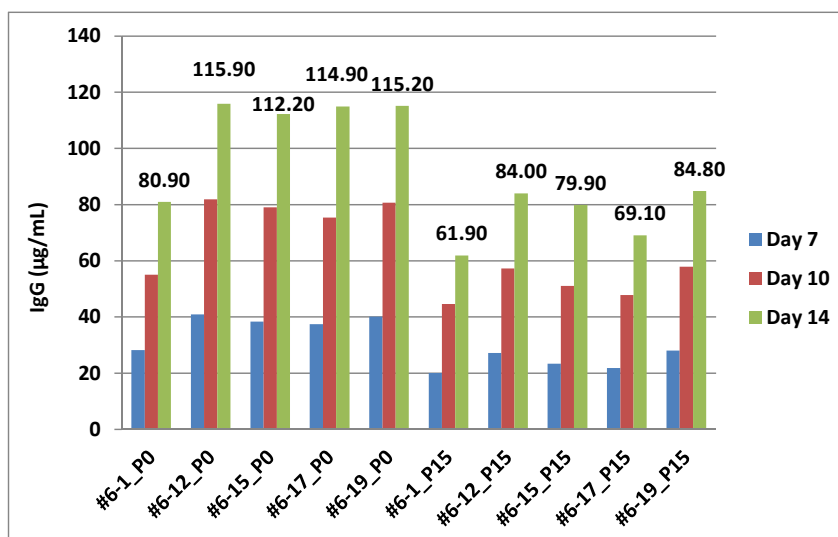


Figure 30 CHO-O1 PDL38 由来の目的遺伝子を搭載した MAC 保有細胞の継代安定性評価

3.2.5 まとめ

今回作製し評価した MAC を保持した CHO 細胞の抗体生産性は 95~131 mg/L と株間で差異は認められなかった。しかしながら、前項の *hprt* 遺伝子座を標的とした部位特異的遺伝子導入法によって構築した抗体生産細胞の生産性 (30~50 mg/L) に比べ 3 倍程度高かったことは、MAC による CHO 細胞への遺伝子導入技術が、染色体上の一領域である *hprt* 遺伝子座よりも抗体生産に適していることを示唆している。また、*hprt* 遺伝子座を標的とした部位特異的遺伝子導入法において、DNA エLEMENT の共導入株が DNA エLEMENT 非導入株よりも数倍高い生産性を示していたことから、MAC に DNA エLEMENT を導入し、かつ、抗体遺伝子の多コピー化が実現すれば、さらなる高発現が期待できるものと考えられる。一方、継代安定性については、人工染色体ベクターとインスレーターを組み合わせることにより染色体上に導入した遺伝子より安定に抗体生産能を保持することを期待していたが、生産能は 15 継代前後で、60~77%にまで低下していた。この生産性の低下は、MAC の脱落によるものと考えられたが、培養に Hygromycin を添加し、選択圧をかけた条件下でも、Specific Production Rate (SPR) は回復しなかった。サイレンシングまたは MAC からの抗体遺伝子の脱落が原因のひとつとして考えられた。

人工染色体ベクターを利用したバイオリジクス生産系への応用は、Chromos Molecular Systems, Inc. の artificial chromosome engineering system (ACE System) がリードしており、この技術を利用して構築した抗体生産株の生産性は 1~4 g/L を達成している(98,100)。これは、この ACE System の人工染色体ベクターが attP 配列を約 100 コピー搭載しており、これに目的遺伝子と attB 配列を搭載するベクターを導入し、phiC31 酵素による部位特異的相同組換え反応により、人工染色体ベクターに目的遺伝子を複数コピー導入することが可能であるためである(101)。本 MAC 技術においても目的遺伝子の多コピー化が実現できれば、同様の高い生産性が達成されることが期待される。また、人工染色体ベクターの他の利用方法として、ACE System で既に応用されているように(97)、目的遺伝子の挿入位置の影響を受けないため、宿主細胞の生産能の比較やプロモーターや *cis* (DNA) エLEMENT の性能比較、さらに、目的遺伝子のコドン最適化検討などに応用可能であり、引き続き注目すべき技術である。

第4章. 高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発

4.1 フローサイトメトリー（FCM）を利用した抗体高生産細胞の濃縮方法の開発

4.1.1 要旨

本章では、FCM を利用した高生産細胞の効率的選抜方法の開発を目的としている。形質転換によって得られる Stable Pool は、様々な形質を示す細胞から構成される不均一な細胞集団である。この細胞集団から目的とする高生産細胞を選抜するために、より効率的な選抜方法の開発が望まれる。そこで、1 秒間に数万細胞を処理することが可能である FCM の機能を活用した細胞選抜方法を検討した。まず始めに、Stable Pool 細胞を蛍光標識した抗 IgG 抗体で直接染色し、FCM により蛍光強度の強い細胞を分画することで高生産細胞の濃縮を試みた。その結果、単に蛍光強度の強い細胞を分画するだけでは、予想に反して抗体高生産細胞の濃縮効果は低く、その生産性は未分画細胞に比べ 1.2-1.3 倍を示した。この結果は、蛍光強度だけで選抜した場合、細胞の大きさによってその細胞表層に存在する抗体量に依存した見かけの蛍光強度が強くなり、本来の抗体生産能力を評価することができないことが示唆された。そこで、FCM で測定可能な指標である細胞の大きさと細胞密度に着目した。これらの指標で分画した細胞群の中で、特に、細胞及び細胞内密度が小さいものを含む画分から、蛍光強度が強い細胞を分画した結果、未分画細胞に比べて 3.4-4.7 倍の生産性を示した。さらに、本手法は、複数回繰り返すことによって、高い生産能力を保有する細胞を濃縮することが可能であり、少なくとも 3 回繰り返すことで、生産性は 8.5 倍にまで向上させることができた。

4.1.2 背景

第 3 章で取り上げた部位特異的相同組換え技術は、通常、目的遺伝子を 1 コピーしか導入できない。そのため、ランダム導入あるいは目的遺伝子の導入後に遺伝子増幅させる方法に比べると、生産性が低いのが現状である。事実、第 3 章での検討結果、得られた抗体生産細胞の生産性は 100 mg/L 程度であり期待する生産性には到達しなかった。そこで、様々な形質（生産能）を有する細胞集団を構築（stable pool）し、その中から目的の高い生産能力を有する細胞を効率良く取得するためのスクリーニング方法が開発された場合、抗体を産業利用する上で大きく貢献することができる。実際に、これまでに様々なスクリーニング方法が考案され報告されている。具体的には、Gel microdrop (GMD) 法(102-104)、Matrix-based cell secretion assay(102,105)、Affinity capture surface display 法(102,106)、フローサイトメトリー（FCM）を利用した方法(107-111)、Molecular Devices 社の ClonePix system などである。

FCM は、細胞内外の蛍光を検出し、それを指標に細胞を高速で分離することが可能な装置であり、前述した他の方法に比べて単位時間当たりの処理能力が格段に高い装置である。これまでの様々な研究グループによる FCM を利用した細胞のスクリーニング方法(107-111)において、Meng らは目的タンパク質発現細胞に GFP をレポーターとして共発現させ、GFP の蛍光強度を指標にスクリーニングする方法を報告している(107)。また、DeMaria らは同様に細胞表面タンパク質 CD20 をレポーターとして共発現させ、蛍光標識した抗 CD20 抗体で染色し、その蛍光強度を指標にスクリーニングする方法を報告している(108)。これらの方法では、目的以外のタンパク質、すなわちバイオ医薬品製造における不純物を積極的に発現させるため、実際の抗体生産系として利用するのは困難である。一方で、Yoshikawara らは、比較的除去しやすい蛍光標識したメトトレキサートを用いて、DHFR (dihydrofolate reductase) の発現量に応じた蛍光強度を指標に、高生産細胞をスクリーニングする方法を報告している(109)。しかしながら、この手法は DHFR を選択マーカーとして利用する発現系にしか適用できない。さらに、これら 3 つの報告では、目的タンパク質の発現量を直接評価していない。一方、Brezinsky らは、抗体生産細胞のスクリーニングとして、細胞表面上に留まっている分泌された抗体をターゲットに蛍光標識した抗 IgG 抗体で染色し、その蛍光を指標にする方法を報告している(110)。本手法は非常に有用であるが、細胞の大きさについては考慮されていなかった。また、Shi らは細胞の大きさと細胞内密度を示す Forward Scatter (FSC) と Side Scatter (SSC) を考慮したスクリーニングを考案したが、死細胞の除去に利用して(111)。

我々は、大きい細胞にはより多くの分泌抗体が細胞表層に留まり、同じ産生性であれば、より細胞が大きい方が蛍光強度が高くなると推察し、細胞の大きさと細胞内密度を考慮することで、より効率的なスクリーニング方法が開発可能であると考えた。

そこで本研究では、FCM を利用した、FSC と SSC に基づいた、高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法について検討した。

4.1.3 実験材料及び実験方法

4.1.3.1 培地及び各種試液

4.1.3.1.1 宿主用培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	1000 mL
200 mM alanyl-glutamine	Sigma	20 mL
anti-clumping agent	Life Technologies	2 mL

4.1.3.1.2 C/E 培地

原材料名	メーカー	必要量
CD CHO	GIBCO	600 mL
EX-CELL 325-PF	SAFC	400 mL
CHO Feed Bioreactor Supplement	SAFC	20 mL
200 mM alanyl-glutamine	Sigma	20 mL
HT Supplement (×100)	Life Technologies	10 mL
Phenol red solution	SIGMA	0.5 mL

4.1.3.1.3 生産培地

カスタム培地 DA1 (Life Technologies Corporation) に終濃度 20 mM の HEPES (Life Technologies Corporation) 及び、4 mM の L-glutamine (Life Technologies Corporation) を添加して生産培地を調製した。

4.1.3.2 抗体発現ベクターの導入及び Stable Pool の取得

宿主細胞、CHO-O1 PDL38 に対し、Neon™ Transfection System (Invitrogen) を用いて抗体発現ベクター pDSLH4.1 を導入した。C/E 培地にて 37℃、5% CO₂ で 24 時間の静置培養後、Geneticin (Life Technologies Corporation) にて選択した。トランスフェクションから約 2 週間後に、Geneticin に対する耐性を獲得した Stable Pool を作製した (N=3)。

4.1.3.3 フローサイトメトリー (FCM)

細胞のソーティングは、BD FACSAria Fusion sorter (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) を用いた。2.0×10⁸ cells を遠心、上清を除去した後、冷洗浄液 (2% (w/v) BSA / PBS (-)) にて再懸濁し、細胞の洗浄を繰り返した。これに、1328 µg の fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Human IgG (H+L) (Beckman Coulter Company) または、phycoerythrin (PE) -conjugated Goat F(ab')₂ Fragment Anti-Human IgG (H+L) (Beckman Coulter Company) を添加して、4℃、30 分間染色した。

染色した細胞を洗浄後、5.0×10⁶ cells/mL の細胞濃度になるよう調製した。細胞は BD FACSAria Fusion sorter にて、半導体レーザーで 488 nm で励起し、530/30 bandpass フィルターにて蛍光を検出した。

4.1.3.4 Fed Batch 培養

Stable Pool 及び FCM で分離した細胞は、125 mL 容三角フラスコで Fed Batch 培養によってその生産性を評価した。細胞密度と生存率は、Guava PCA (EMD Millipore Corporation) で測定した。初発細胞密度は、 3.0×10^5 cells/mL とし、30 mL の生産培地を仕込んだ 125 mL 容三角フラスコにて、37°C、5% CO₂、120 rpm の条件下、14 日間培養した。フィードは、DAFM3 (Life Technologies Corporation) を 4、6、8、10 日目に仕込み培地量の 10 %分を添加した。培養 7 日目、10 日目、14 日目の培養液について、細胞密度と抗体濃度 (ProteinA-HPLC) を測定した。

4.1.3.5 細胞周期解析

細胞周期解析は、Guava Cell Cycle Reagent (EMD Millipore Corporation) にて細胞を処理し、FCM で解析した。解析する細胞を遠心分離によって回収し、PBS によって洗浄を繰り返した後、冷 70% エタノール溶液中で 4°C、4 時間で固定化した。固定した細胞を PBS で洗浄し、Guava Cell Cycle Reagent で染色した。染色した細胞は、Guava easyCyte H (EMD Millipore Corporation) で解析した。

4.1.3.6 透過型電子顕微鏡による観察

細胞を、2.5%グルタルアルデヒドならびに 1%オスミウム酸で固定後、洗浄してエタノール脱水し、Quetol-812 樹脂にて包埋した。包埋後、ウルトラトームで超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (H-7500, HITACHI) にて観察した。

4.1.4 結果

4.1.4.1 蛍光強度を指標にした細胞分離

宿主細胞である CHO-O1 PDL38 に抗体発現遺伝子 pDSLH4.1 をトランスフェクションし、Geneticin の選択圧下で増殖した、様々な発現量を示す細胞集団である Stable Pool を調製した。独立した 3 回の形質転換によって作製した Stable Pool (SP-1, -2, -3) に対し、R-Phycoerythrin (PE) 標識した抗 IgG 抗体を用いて染色した後、FCM を利用して蛍光強度上位 10% 分を P1 画分として回収した (Figure 31 A)。この P1 画分と FCM していない Stable Pool について、125 mL 容三角フラスコによる 14 日間の Fed Batch 培養にて生産性を比較した。その結果、P1 画分は Stable Pool に比べ、1.2-1.3 倍の生産性を示した (Figure 31 B)。

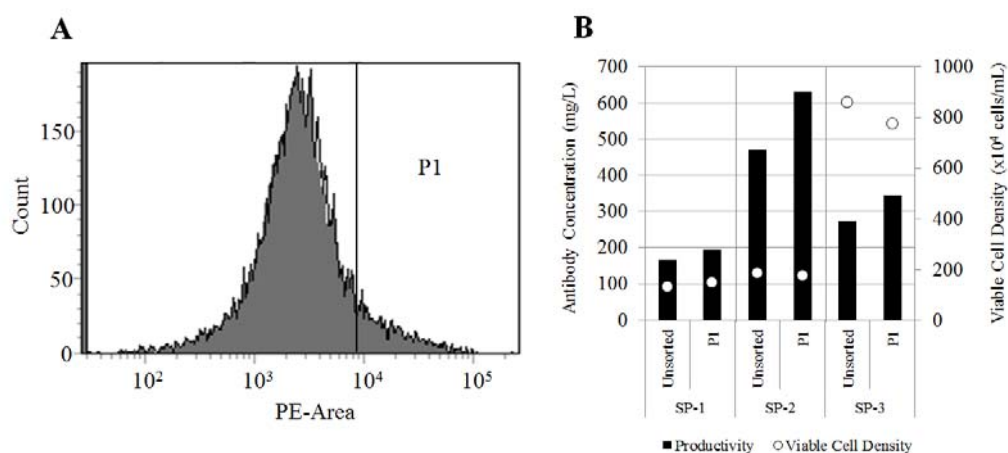


Figure 31 蛍光強度による細胞の分離 (A : 蛍光強度のヒストグラム (P1 : 蛍光強度トップ 10%)、B : Stable Pool と P1 画分の生産性比較)

4.1.4.2 Forward Scatter (FSC) と Side Scatter (SSC) を指標とした細胞分離

蛍光強度の上位 10% の P1 画分の細胞は、未分画である Stable Pool より高い生産性を示したが、その分画効果は期待したほど高くなかった。細胞が示す蛍光強度は、細胞の大きさに比例する、つまり、細胞が大きいと細胞表層により多くの産生抗体を提示できる可能性がある、つまり、細胞の大きさを考慮して分画すればより効率良く高生産細胞が濃縮できることが推察された。そこで、この仮説に基づき、細胞の大きさの指標となる Forward Scatter (FSC)、さらに細胞内密度の指標である Side Scatter (SSC) を考慮した分画を試みた。

FCM を使用して Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗 IgG 抗体で染色した細胞を SSC で 2 分割、さらに 2 分割したそれぞれの分画をさらに FSC で 4 分割するゲートを設定した。高 SSC で FSC が低い方から P3、P4、P5、P6 画分とし、同様に低 SSC で FSC が低い方から P7、P8、P9、P10 画分とした。この 8 画分したゲートからそれぞれ蛍光強度の上位 5% の画分を回収した。P3 画分から回収した上位 5% の画分を P11 画分とし、同様に P4 画分から

P12 画分を、P5 画分から P13 画分を、P6 画分から P14 画分を、P7 画分から P15 画分を、P8 画分から P16 画分を、P9 画分から P17 画分を、P10 画分から P18 画分を分画し、それぞれの画分から $15\text{-}25 \times 10^4$ cells を回収した (Figure 32 A, B)。

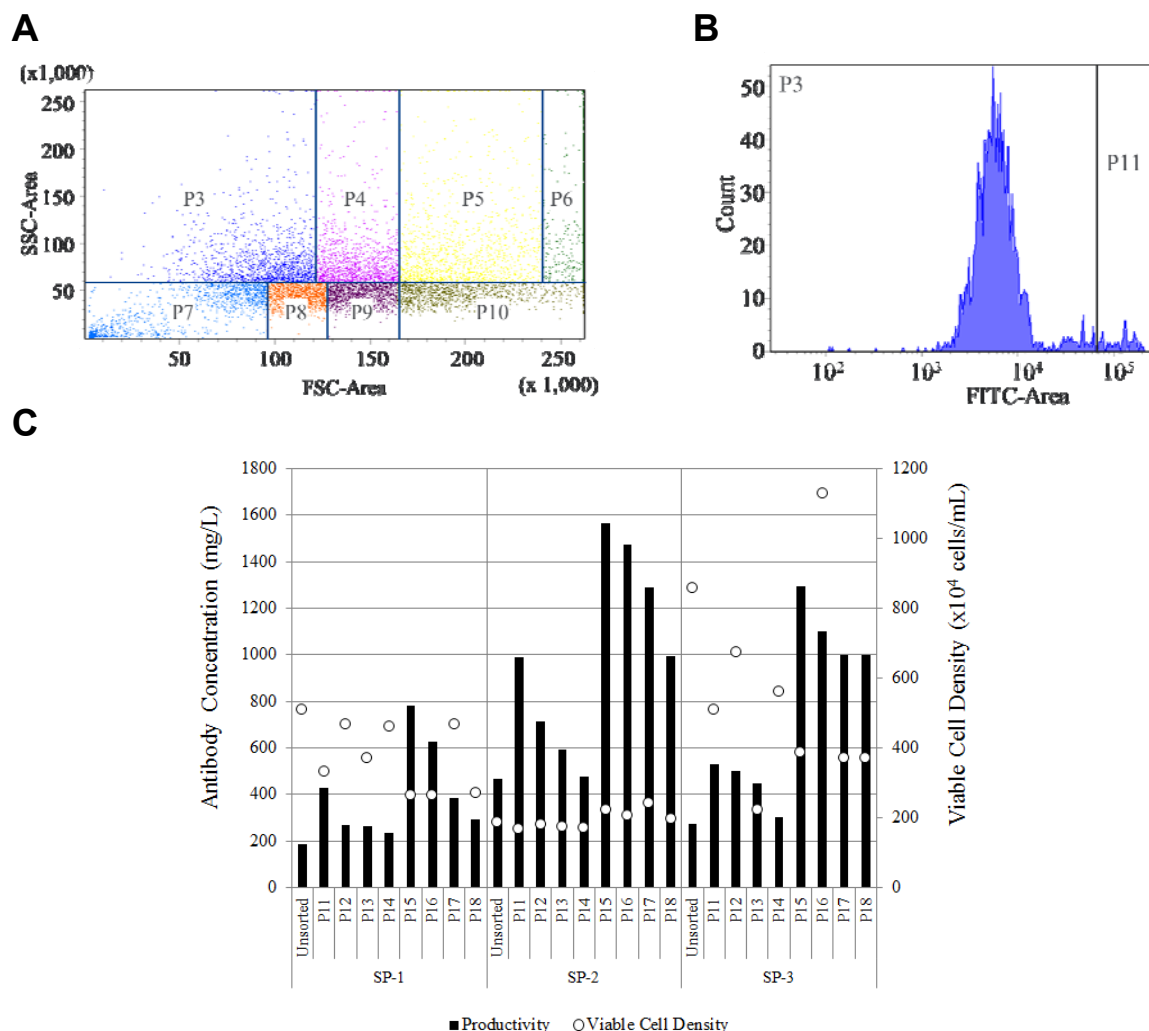


Figure 32 FSC 及び SSC を指標に 8 分画して得られた細胞集団の特性 (A: SSC と FSC のドットプロット及び分画方法、B: P3 の蛍光強度のヒストグラム (P11 は P3 の蛍光強度トップ 5%)、C: 分画した 8 分画の細胞と Stable Pool の生産性の比較 (N=3))

SP-1 およびその分画細胞の FSC-Area、SSC-Area、FITC-Area の平均値の相対値 (SP-1 の値を 100) を Table 11 に示した。

Table 11 分画した細胞の FSC, SSC, FITC の平均値の相対比較 (SP-1)

Group	Relative rate (%, Means of Area)		
	FSC	SSC	FITC
Unsorted	100	100	100
P11	60	223	1461
P12	93	269	1194
P13	133	294	1349
P14	174	344	1551
P15	25	46	269
P16	75	72	85
P17	98	72	83
P18	138	73	96

FSC の平均値は P11 画分から P14 画分、P15 画分から P18 画分に向かって設定したゲートの設定通りであった。SSC は P11 画分から P14 画分へは同様に高くなったが、P15 画分から P18 画分については差異は認められなかった。蛍光強度 (FITC) は、P14 画分が全ての細胞において最も強く、P11 画分から P14 画分においては、FSC が高くなるにつれて強くなった。一方、P15 画分から P18 画分においては異なる傾向を示し、その中で P15 画分が最も高かった。これら分画した細胞と Stable Pool について、125 mL 容三角フラスコによる 14 日間の Fed Batch 培養にて生産性を比較した (Figure 32 C)。その結果、分画した細胞全てが元の Stable Pool に比べて高い生産性を示した。中でも FSC と SSC が一番小さい P15 画分が最も高い生産性を示し、Stable Pool と比べて 3.4-4.7 倍となった。

4.1.4.3 8 分画した細胞の細胞周期解析

SP-1 及び P3-P10 画分で得られた細胞について、FCM による分画直後の細胞周期を解析した。G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を Table 12 に示した。

Table 12 SP-1 の細胞周期解析 (G0/G1 期、S 期、G2/M 期)

Group	Percentage of each cell cycle (%)		
	G0/G1 phase	S phase	G2/M phase
Unsorted	49	21	30
P3	35	22	43
P4	41	21	38
P5	51	18	32
P6	45	20	35
P7	68	21	11
P8	73	17	11
P9	67	19	14
P10	70	19	11

SP-1 は、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合がそれぞれ 49%、21%、30%を示した。SSC の高い画分である P3-P6 画分は、SP-1 に比べ G0/G1 期の割合が低く、G2/M 期の割合が高かった。一方、SSC の低い画分である P7-P10 画分は、G2/M 期が少なく、G0/G1 期の割合が高くなった。なお、FSC の違いは細胞周期に影響しなかった。

4.1.4.4 FCM を繰り返すことによる高生産細胞の濃縮効果

最も高い生産性を示した P15 画分について、FCM による分離・分画を繰り返すことで、より生産性の高い細胞を濃縮できるのではないかと推察し、さらに 2 回の FCM による分離を試みた。2 回目、3 回目の分画を P15-P15 画分、P15-P15-P15 画分として、その生産性を評価した。その結果、SP-1 については更なる濃縮効果が観察されたが Figure 33、SP-2 及び SP-3 については繰り返し効果は観察されなかった (data not shown)。

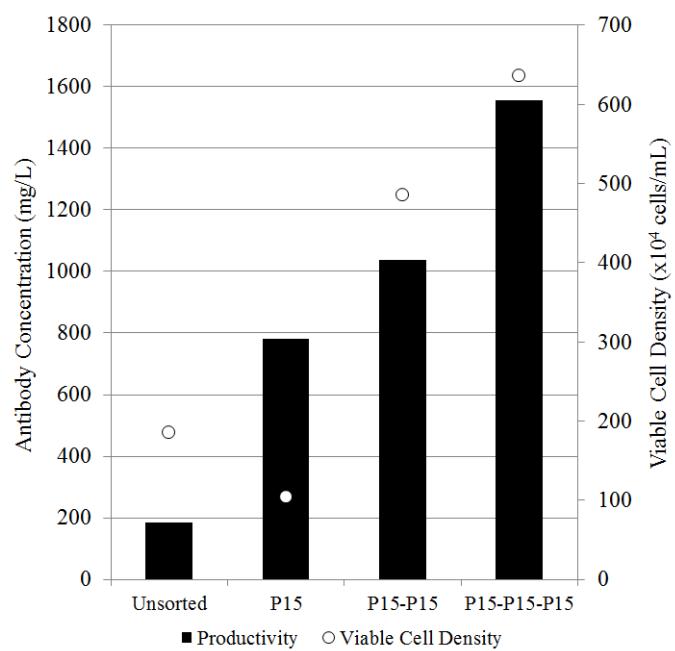


Figure 33 FCM を繰り返すことによる高生産細胞の濃縮効果

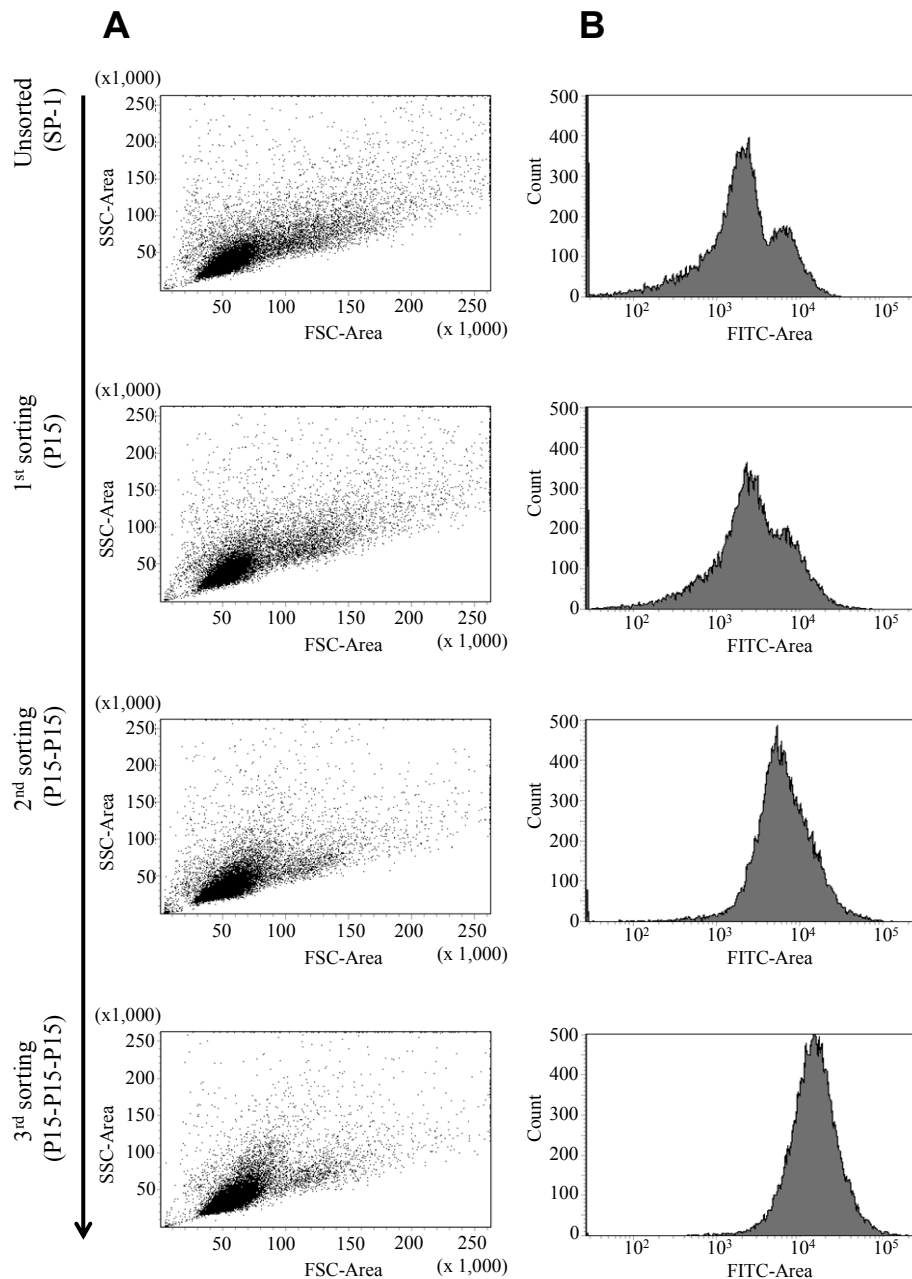


Figure 34 FCM を繰り返した各細胞の SSC、FSC のドットプロットと FITC ヒストグラム (A : SSC と FSC のドットプロット、B : FITC のヒストグラム)

SP-1 に関して、FCM を繰り返すことによって、回を重ねるごとに生産性が上昇し、P15-P15-P15 画分 (1556 mg/L) は SP-1 (184 mg/L) に比べて、8.5 倍の生産性を示した。そこで、さらに濃縮効果が得られるかどうかを確認するため、4 回、5 回と FCM を繰り返したが、これ以上濃縮されることはなかった (data not shown)。

次に、FCM を繰り返した細胞を詳細に解析するため、それぞれの細胞の SSC、FSC のドットプロット (Figure 34 A) と FITC のヒストグラム (Figure 34 B) を確認した。FCM では FSC

及び SSC の最も小さい画分である P15 画分を取得しているが、増殖後に解析すると、FCM による分離を行ってない細胞と同様な SSC/FSC の分布を示した。一方、FITC のヒストグラムについては、FCM を繰り返すことで、ピークトップが高い方向にシフトした。

4.1.4.5 透過型電子顕微鏡によるオルガネラ観察

SP-1 及び FCM で分画した細胞のオルガネラを透過型電子顕微鏡で観察した。最も低い生産性を示した P14 画分と最も高い生産性を示した P15 画分の電顕写真を Figure 35 に示した。

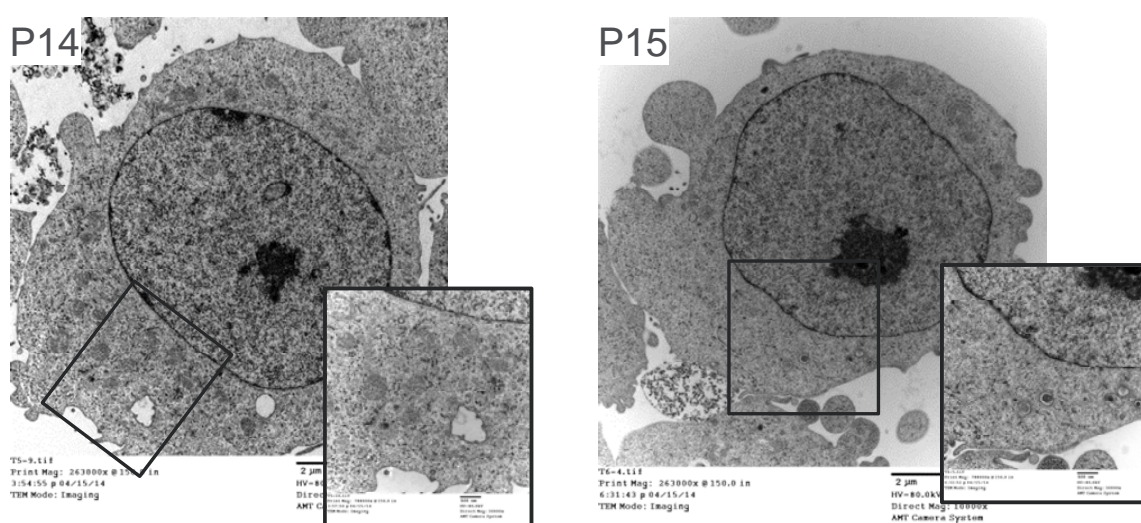


Figure 35 P14 画分（左）および P15 画分（右）の TEM 観察

オルガネラ、特に分泌に関わる小胞体やゴルジ体の形態に違いがあると推察したが、予想に反して、P14 画分と P15 画分との比較において差異は観察されなかった（Figure 35）。

4.1.5 まとめ

本研究では、単位時間あたりに圧倒的な処理能力を有する装置 FCM を用いた新たなスクリーニング手法を用いて効率的に高生産細胞を濃縮することを目的とした。はじめに実施した、単純に蛍光強度が強い細胞を回収する方法では、効果的に高生産細胞を濃縮することができなかった。一方、これまでに実施されていなかった FSC と SSC に基づいた分離方法においては、より効果的に高生産細胞を濃縮することができた。その中で、FSC と SSC が最も小さい P15 画分の細胞は、Fed Batch 培養で最も高い生産性を示したが、驚くべきことに、蛍光強度は他のフラクションの細胞よりも弱かった。このことから、高生産細胞を濃縮するた

めには、蛍光強度だけではなく、FSCやSSCについても考慮すべきであることが示唆された。Table 12 が示すとおり、SSC が高い画分、P3-P6 画分においては、G0/G1 期の細胞が少なく、G2/M 期の細胞が多かった。一方、SSC が小さい画分、P7-P10 画分においては、G0/G1 期の細胞が多く、G2/M 期の細胞が少なかった。このことは、細胞周期と FSC 及び SSC との間に関係性があることを示唆している。さらに、Figure 33 が示すように、複数回の FCM による分離により、高生産細胞をさらに濃縮することができた。SP-1 に比べて 3 回の FCM 分離を行った細胞の 14 日間の Fed Batch 培養の抗体生産性は、8.5 倍にもなった。我々は、SP-2、SP-3 及び SP-1 から濃縮した P15-P15-P15 画分に対して、更なる濃縮を試みたが、それ以上、濃縮することはできなかった。この現象は、本条件（発現ベクター、宿主、培地）での飽和ポイントが生産性 1500 mg/L 付近にあったこと、また、濃縮効率が期待していたほど一様ではなかった、つまり、Stable Pool によって条件が異なることが原因で引き起こされたことが推察された。

Table 12 に示すように、細胞の FSC と SSC の分布は、細胞周期を含む細胞の形態の複雑さや多様性の指標となりえることが示されたが、分離される時の細胞の形態は、細胞の状態全ての中のほんの一部を反映しているに過ぎない。このことは Figure 34 が示すとおり、FSC と SSC が小さい画分である P15 画分の分離を繰り返しても FSC と SSC の分布があまり変化しないことによって支持される。

今回、P15 画分の細胞が最も高い生産性を示したが、これは当初の予想（細胞の大きさで分画し、それぞれ蛍光強度の高い細胞を分画すれば、同等の生産性を示すという仮説）に反するものであった。この現象は、他の異なる 2 種類の宿主細胞を用いて、pDSLH4.1 及び異なる発現ベクターを用いて実験を実施したところ、同様に P15 画分が最も高い生産性を示した（data not shown）。また、Figure 36 に示すデータもこの現象を支持した。

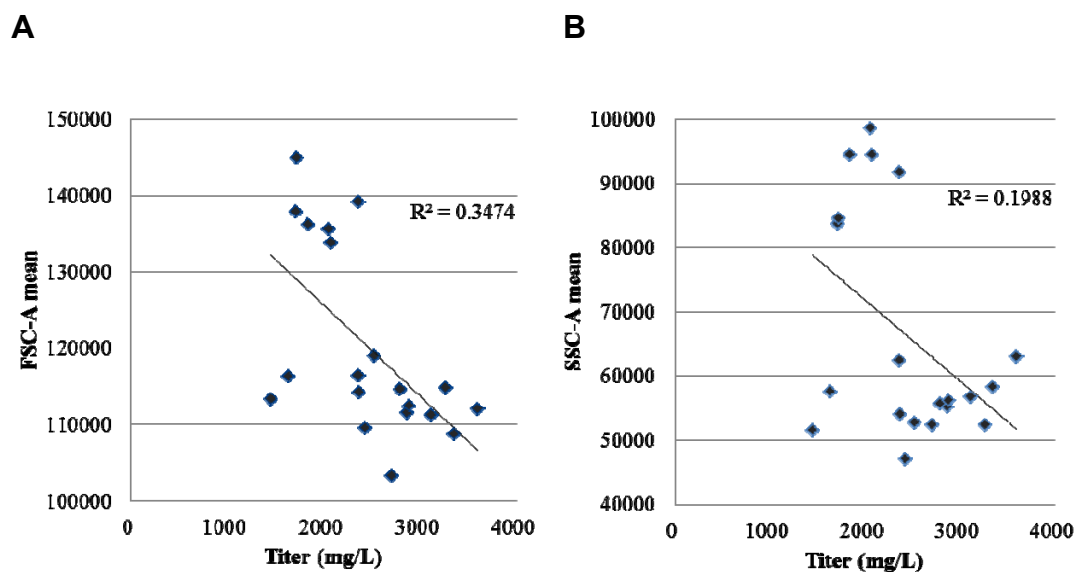


Figure 36 生産性と FSC (A)、生産性と(SSC) (B)の関係（生産性既知の抗体生産株 20 株分のデータを取得）

以上の結果は、この現象が一般化でき、今回提唱する新たなスクリーニング方法が、他の CHO 発現系にも応用できることを示唆している。一般的に、高生産細胞は、目的物質の生産にエネルギーを使うため、増殖速度は遅いとされている。また、細胞の体積や重量は、培養条件や比増殖速度によって変化することが知られている(112,113)。さらに、染色体本数と細胞の大きさ、さらに比増殖速度は密接に関係していることが報告されている(114)。

SSC は細胞内密度を示すことから、Stable Pool と分画した細胞との間に、小胞体やゴルジ体などのタンパク質分泌に関連する小器官の変化（影響）が予想されたため、透過型電子顕微鏡による観察を行ったが差異は観察されなかった。今後、細胞の大きさと生産性、細胞内密度と生産性の関連性について明らかにするためには、細胞増殖特性解析やマルチカラー fluorescence *in situ* hybridization による染色体の核型解析などを実施する必要がある。一方で、SSC の違いで細胞周期に差が生じていたことは、この現象を説明するための手がかりになるかもしれない。

以上の結果、FSC と SSC が小さい画分において、高生産細胞が濃縮されていることを見出し、さらに、この方法が高生産細胞を濃縮する方法として非常に有用であることを確認した。

4.2 96 deep well plate (DWP) を利用した抗体生産性評価系の開発

4.2.1 要旨

本章では、96DWP を利用した生産性評価方法の構築によって、高生産細胞スクリーニング方法の効率化を図ることを目的としている。Bioreactor の培養結果を比較的良く反映する 125 mL 容三角フラスコの評価系をベンチマークとして検討した。その結果、96DWP の評価系において、125 mL 容三角フラスコの評価系を再現するためには、振盪速度、フィード方法、培地の安定性が重要因子であることを見出し、これらの条件を最適化することで、125 mL 容三角フラスコの結果を再現する 96DWP による評価方法を構築することができた。

4.2.2 背景

前項で開発した FCM を利用して濃縮した抗体生産細胞の生産性を評価するためには、多くの抗体生産株の生産性をいかに簡便に評価するかが重要となる。一般的に培養スケールを小さくすれば、抗体生産株 1 つ当たりの評価に要する労力は減るが、実スケールの生産性を再現するのが困難になる。そのため、125 mL 容三角フラスコなどによる培養評価系が多用されている。pH や温度を制御し、多検体を同時に培養することができる培養装置 Ambr (GE 社) などが開発されているが(115)、専用装置が必要で、ランニングコストが高いことが問題である。また、安価な方法として、125 mL 容三角フラスコや 2 L 培養装置での培養結果を再現することが可能な 24 well plate を利用した抗体生産性の評価系が開発されているが(116,117)、より高効率な評価系の開発が求められている。その方法として 96 well plate による評価系が検討されているが(118)、培養 2 日間の結果しか報告されておらず、蒸発の問題のためか、96 well plate による評価系開発の困難さが伺えた。

そこで本研究では、簡便でハイスループットな方法として、96 deep well plate (DWP) を用いた評価方法の確立を目指した。

4.2.3 実験材料及び実験方法

4.2.3.1.1 生産用培地

評価に用いた生産培地は以下の3種類のカスタム培地である。

Medium Name	Basal-/Feed-Medium	Protein	Vender	Additives
生産培地-1	DA1/DAFM3	Free	Life Technologies	10 mM HEPES 4 mM L-Gln
生産培地-2	G13/F13	+	JX※	10 mM HEPES 1 mM L-Gln
生産培地-2	C/E/FM4Ae2	Free	Life Technologies	10 mM HEPES 4 mM L-Gln

※JX Nippon Oil&Energy Corporation

4.2.3.2 抗体生産株

抗体生産株#544 及び#244 を用いた。これらは前述の宿主細胞、CHO-O1 PDL38 及び抗体発現ベクターpDSLH4.1 を用いて構築した抗体生産株である。

4.2.4 結果

4.2.4.1 プレートの種類及び振盪速度検討

抗体生産株#544、#244 を用いて、プレートの種類と振盪速度を検討した。プレートの種類としては、一般的な 96 well plate (greiner bio-one) (以下、96WP) と 96 deep well plate (Treff AG) (以下、96DWP) の2種類であった。96WP における振盪速度は、静置、700、1000 rpm の3条件を設定した。一方で、96DWP では、1000、1400 rpm の2条件を設定した。コントロールとして、125 mL 容三角フラスコを置き、Fed Batch 培養を実施した。Table 13 に培養条件をまとめた。

Table 13 プレートの種類及び振盪速度検討条件

項目	コントロール	条件① (96WP)	条件② (96DWP)
抗体生産株	#544、#244		
初発細胞密度	30x10 ⁴ cells/mL		
生産培地	生産培地-1、生産培地-2		
培養容器 (メーカー)	125 mL 容三角フラスコ (corning)	96-well plate (greiner bio-one)	96-deep well plate (Treff AG)
仕込み量	30 mL	200 µL	600 µL
振盪速度	120 rpm	0, 700, 1000 rpm	1000, 1400 rpm
条件	37°C、5% CO ₂		
培養期間	14 days		
Feed 添加	4、6、8、10 日目に 仕込み量の 10%添加	蒸発した量を添加	

Table 14 Feed 培地の添加量 (実績)

コントロール	条件① (96WP)	条件② (96DWP)
40 % (対 Initial Volume)	静置 : 40%	1,000 rpm : 47%
	700 rpm : 240%	1,400 rpm : 67%
	1,000 rpm : 285%	(対 Initial Volume)
	(対 Initial Volume) Day 3 から添加	Day 3 から添加

検討の結果、Feed 培地の添加量は、Table 14 の通りとなった。生産性の結果を Figure 37 及び Figure 38 に示した。96WP 及び 96DWP の生産性は 125 mL 容三角フラスコに比べて非常に低い値を示した。96WP に関しては、株及び培地の違いも再現することはできなかった。一方、96DWP は、生産性は低い値を示したものの、株及び培地の違いを再現することができた。振盪速度は 1400 rpm の方が 1000 rpm よりも生産性が高かったが、フィード量は多くなった。以上より、96DWP、1400 rpm の条件をベースにフィード方法の検討を行った。

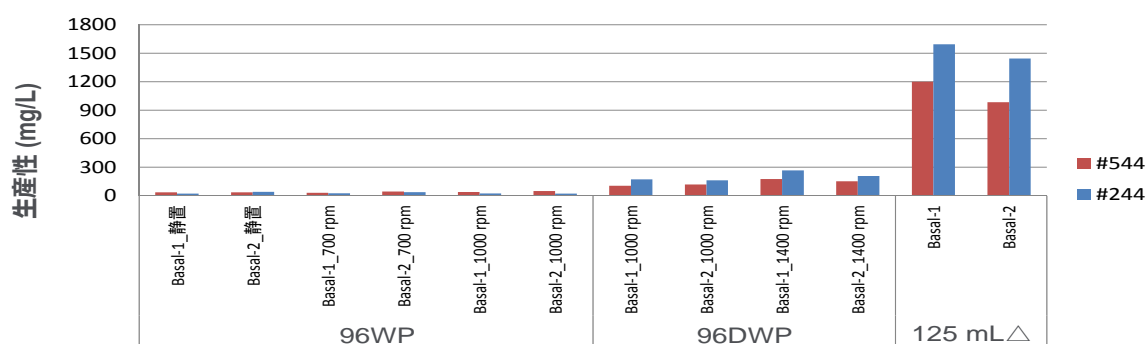


Figure 37 プレートの種類と振盪速度検討の結果

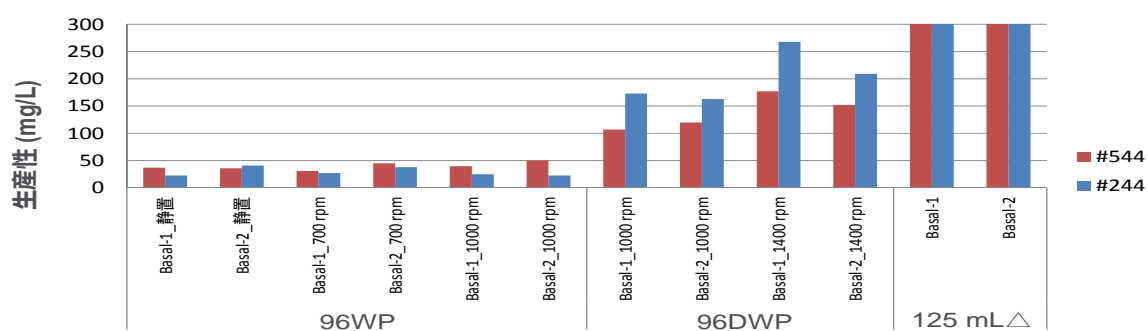


Figure 38 プレートの種類と振盪速度検討の結果（拡大）

4.2.4.2 フィード方法の検討

抗体生産株#544 を使用して、96DWP、1400 rpm の条件を基本として、フィード方法を検討した。以下の2条件について検討した。条件①では、コントロールと同じく、培養4、6、8、10日目に仕込み液量の10%のフィード培地を添加した。条件②では、フィード培地を水で2倍希釈してコントロール条件の2倍量を添加する方法である。詳細な条件をTable 15に示した。

Table 15 フィード方法の検討条件

項目	コントロール	条件①	条件②
抗体生産株	#544		
初発細胞密度	30x10 ⁴ cells/mL		
生産培地	生産培地-1、生産培地-2		
培養容器 (メーカー)	125 mL Δ (corning)	96-Deep well plate (Treff AG)	
仕込み量	30 mL	600 μL	
振盪速度	120 rpm	1400 rpm	
条件	37℃、5% CO ₂		
培養期間	14 days		
Feed 添加	培養 4、6、8、10 日目に 仕込み量の 10%添加		フィード液を水で 2 倍希釈して 培養 4、6、8、10 日目に 仕込み量の 20%添加

生産性を比較した結果を Figure 39 に示した。この結果、両条件の生産性は劇的に改善した。このことは、前の検討結果も踏まえ、フィード培地の添加量や添加のタイミングが重要であることを示唆している。コントロールと同条件である条件①の生産性は改善されたものの、コントロール条件の約半分の生産性であった。一方、フィード培地を 2 倍希釈してフィードする条件②では、生産培地-1 による生産性は、コントロール条件と同等となったが、生産培地-2 は、コントロール条件を再現することはできなかった。そこで、次の検討を行った。

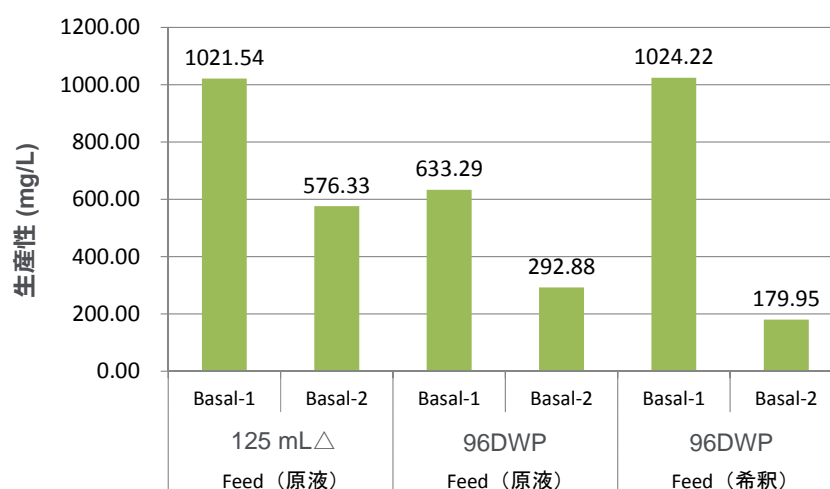


Figure 39 フィード方法の検討結果

4.2.4.3 培地の安定性評価検討-1

96DWP の培養評価における培地の影響を検討した。培地成分の詳細については製造元から開示されていないが、生産培地-1 はタンパク質成分を含まず、生産培地-2 は含んでいることが分かっている。このことが、生産培地-2 がコントロール条件を再現しない原因と考えた。そこで、生産培地-1, -2 をそれぞれ 37°C、5% CO₂ 環境下で 3 日間 1,400 rpm で振盪することで劣化させ、劣化培地と新鮮培地の 2 種類、計 4 種類の培地を用いて 125 mL 容三角フラスコによる Fed Batch 培養を行った。Figure 40 に、新鮮培地を 100%とした相対評価結果を示した。生産培地-1 は、インキュベーションした培地においても生産性の低下は見られなかったが、生産培地-2 では約 50%まで低下し、培地成分（タンパク質成分と考えられる）の劣化を示唆する結果が得られた。

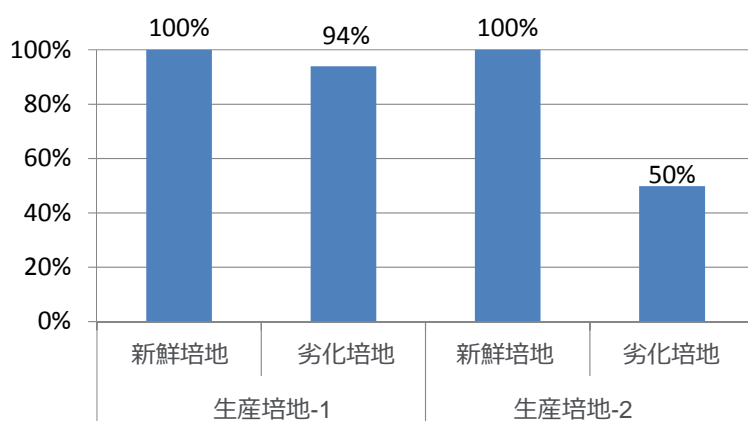


Figure 40 培地安定性評価（劣化培地 vs 新鮮培地）

次に、得られた結果を検証するため、タンパク質成分を含まない異なる生産培地-3 を用いて、#544 を 125 mL 容三角フラスコと 96DWP にて Fed Batch 培養を行った。その結果、Figure 41 に示す通り、125 mL 容三角フラスコと 96DWP と生産性は同等であった。以上のことから、96DWP での培養評価には、タンパク質成分を含まない培地を用いることとした。

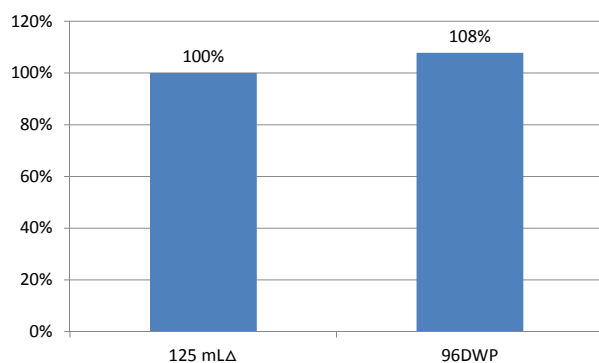


Figure 41 生産培地-3 を用いた培地安定性評価（125 mL 容三角フラスコを 100%とした相対評価）

4.2.5 まとめ

本検討の結果、96DWP の培養評価において、125 mL 容三角フラスコの結果を反映させるためには、振盪速度、フィード方法、培地の安定性（タンパク質成分の有無）が非常に重要な因子であることを見出した。また、これらの因子を最適化することで、96DWP の培養評価において、125 mL 容三角フラスコの結果を反映させることに成功した。

第5章. 総括

バイオ医薬品の市場規模は年々拡大しており、世界の医薬品市場拡大の牽引力となっている。特に抗体医薬品の市場規模は、2020 年まで成長すると見込まれていることやバイオ医薬品の薬剤費が高騰していることを背景に、低コスト化を実現するバイオ医薬品、特に抗体医薬品の製造プロセスの効率化が求められている。

一方で、抗体医薬品の生産方法は、CHO 細胞を宿主として利用する方法が確立されているが、これまでの製造方法をさらに効率化し、差別化の原動力とすることが必要であると考えられる。原核生物、下等真核生物、昆虫細胞、植物、トランスジェニック動物等、様々な生産系による抗体医薬品の生産方法も検討されているが、抗体分子の特殊性（高分子、構造の複雑さ（ヘテロテトラマー、N 型糖鎖修飾））から、CHO 細胞に勝る発現系は今のところ見出されていない。より広く利用される高効率の抗体生産系を開発するためには、まずは高生産細胞の開発方法の確立が必須である。抗体生産細胞の抗体生産能力は、宿主の能力、発現ベクター構成要素（プロモーター、高発現、安定発現に効果を示す *cis* (DNA) エlement、選択マーカー、抗体遺伝子のコドン最適化など）の開発、さらに、発現ベクターの導入方法、導入様式（宿主の染色体のどこに取り込まれるか（取り込ませるか））で決まる。そして、様々な生産能を有する細胞の集団から高い生産能力を有する細胞を高効率で取得するための、スクリーニング方法の開発が重要となってくる。これまでの研究から、高発現を実現する新規プロモーターと導入遺伝子構成体の発現を促進する DNA エlement を搭載した抗体発現ベクター pDSLH4.1 が開発されている（unpublished data）。そこで、本論文では、開発してきた技術をさらに高効率で利用し、抗体をはじめ様々なバイオ医薬品の生産に適応可能な高効率バイオリクス生産系の開発を目指し、高生産細胞構築に必要な宿主細胞の樹立と改変、抗体遺伝子の細胞への導入方法（部位特異的相同組換え技術及び人工染色体ベクター）の検討、フローサイトメトリー（FCM）を利用した高効率な高生産細胞の濃縮方法の開発及びその評価に適用する 96 deep well plate による抗体生産性評価系を検討した。

第 2 章「高生産を実現する宿主細胞の開発」では、増殖に血清を要求し、接着細胞である CHO-K1 ATCC[®] CCL-61[™] を無血清・浮遊馴化させた過程の一連の細胞を解析することで、抗体生産に適した宿主を選抜した。CHO-K1 細胞から無血清・浮遊馴化したと判断した時点の細胞を PDL（集団倍加レベル；Population doubling level）0 とし、さらに継代して得られる一連の細胞（PDL0～PDL100）について特性解析（増殖性、接着性、抗体生産能、レクチンアレイ解析）を行った。その結果、継代を経るほど、増殖性は向上、接着性は低下した。また、抗体生産能は向上するが PDL38 付近で極大、細胞表層の $\alpha 2, 3$ シアル酸量は低下するが PDL28

付近で極小を示し、細胞表層の $\alpha 2, 3$ シアル酸含量と抗体生産能との間に相関関係が見出された。さらに、 $\alpha 2, 3$ シアル酸を認識するレクチン、MAL を用いたレクチンキャプチャーにより、関連因子を探索した結果、ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1) や Integrin などの接着因子が同定された。CHO-O1 PDL0~PDL100 における接着性などの様々な変化は、関連するタンパク質の発現量の変化だけではなく、糖鎖構造の変化によるタンパク質の機能変化に起因していることが推察された。また、これらの糖鎖構造の変化は糖転移酵素以外のタンパク質の発現によっても引き起こされることから、糖鎖構造の変化だけではなく、ゴルジ体に存在する様々なタンパク質の発現状況の違いが、CHO-O1 PDL0~PDL100 における増殖性、生産性及び接着性の変化を引き起こしたと推察された。このような観点も考慮し、増殖特性、目的抗体生産性の評価結果から、抗体生産に適した宿主細胞として PDL38 の状態の細胞を CHO-O1 PDL38 として宿主バンクとして樹立した。続いて、構築した CHO-O1 PDL38 の抗体生産能向上を目指し、不均衡変異導入法による宿主細胞の分子育種を試みた。細胞の育種では、約 1.2 g/L の生産性を示す抗体生産株 (CHO-O1 PDL38 に pDSLH4.1 を導入して構築した抗体生産株) を親株として、①不均衡変異導入による変異ライブラリーの構築、②高生産細胞の選抜、③再導入評価を 1 ラウンドとして合計 3 ラウンドの変異ライブラリーの構築によって実施された。その結果、元の生産株よりも生産性が約 2.2-2.5 倍に向上した生産細胞の取得に至った。抗体をレポーターとして、育種した抗体生産株は、抗体遺伝子を Cre-loxP 部位特異的組換えにより除去することが可能になるよう設計されており、事実、抗体遺伝子の除去に成功し宿主細胞として他の抗体生産の宿主としても利用可能である。この分子育種工程は、今後多くの研究をもたらすと考えている。タンパク質、特に抗体のような複雑な構造と多様性を有するタンパク質の分泌生産では、小胞体での品質管理機構、ゴルジ体での糖鎖成熟化、分泌経路での輸送と様々な因子が複雑に関係する複合的要因によって生産能が向上していることが推察される。今後、オミクス等の研究によってより詳細に解析が進むことを期待している。

第 3 章「抗体遺伝子導入方法の検討」では、*hpmt* 遺伝子座への部位特異的相同組換え技術とマウス由来人工染色体 (MAC) ベクター技術の評価を中心に行った。遺伝子導入位置の制御は、規制科学の観点からも導入様式を容易に解析することができ、また、より短時間で目的抗体生産細胞を樹立できる可能性がある。そのため、スクリーニング方法に依存せず、より選択的に目的抗体生産細胞を取得できることが期待される。そこで、導入マーカーとしても利用可能であり、CHO 細胞内でハウスキーピング遺伝子であることが知られている *hpmt* 遺伝子を標的とした部位特異的相同組換え法を評価した。その結果、その生産性は少なくとも 4 週間に渡る継代培養においても安定に維持されたが、実際には 30~50 mg/L 程度であっ

た。さらに発現構成体からの転写を促進することが期待される DNA エlement を共導入した場合でも最大 180 mg/L であった。本結果は、部位特異的相同組換えによって迅速に抗体生産細胞を樹立することは可能であるが、その染色体上の領域の外来タンパク質発現に対する適正な領域を見出さなければ、1 コピーの発現構成体からの抗体生産能は満足行くものではなかった。今後、部位特異的に導入するための染色体領域のクローニング、または、発現構成体のより高機能化、さらに迅速なコピー数の増加技術の開発が必要になるであろう。

一方で、鳥取大学大学院 医学系研究科 押村 光雄教授らが開発した、マウス由来人工染色体 (MAC) ベクター技術の抗体生産株構築への適用を検討し、得られた組換え細胞における抗体生産性、継代安定性について評価した。その結果、生産性は 95~131 mg/L を示し、株間での差異は認められなかった。また、その生産性は約 2 ヶ月間の継代培養で約 70%を維持していた。コピー数の制限を受ける両技術では、更なる技術開発が必須となるであろう。現時点では、高効率抗体生産細胞の樹立のためには、様々な形質を有する抗体産生細胞の集合である stable pool からの高効率抗体生産細胞の選抜方法を開発することが重要であると考え第 4 章の研究へと発展した。

第 4 章では、「高効率な抗体高生産細胞スクリーニング方法の開発」について検討を行った。本検討では、FCM を利用した高生産細胞の濃縮方法を開発した。不均一な細胞集団である Stable Pool に対し、蛍光標識した抗 IgG 抗体で染色、FCM により蛍光強度の高い細胞を分画することで高生産細胞の濃縮を試みた。その結果、単に蛍光強度の高い細胞を分画するだけでは濃縮効果が低く、その生産性は未分画細胞に比べ 1.2-1.3 倍であった。続いて、細胞及び細胞内密度が小さく、かつ蛍光強度が高い細胞を分画したところ、未分画細胞に比べて 3.4-4.7 倍の生産性を示した。さらに、本手法を 3 回繰り返すことで、生産性は 8.5 倍までに向上させることができ、非常に簡便な方法で高生産細胞を濃縮することができる方法が開発できた。次に、濃縮した細胞を簡便かつ単位あたりの処理能力の高い抗体生産性評価方法として、96 deep well plate (DWP) を利用した生産性評価系を開発し、スクリーニング方法の効率化を図った。Bioreactor の培養結果を比較的良く反映する 125 mL 容三角フラスコの評価系をベンチマークとして検討した結果、96DWP の評価系において、125 mL 容三角フラスコの評価系を再現するためには、振盪速度、フィード方法、培地の安定性が重要因子であることを見出し、これらの条件を最適化することで、125 mL 容三角フラスコの結果を再現する 96DWP による評価方法を構築することができた。

以上より、高効率抗体生産方法の開発に寄与することができる宿主細胞の樹立から抗体高生産細胞取得までの一連の過程に目処が立った。今後は更なる宿主ベクターの高機能化、次の重要工程である培養プロセス開発手法の開発によって低コストを実現する抗体医薬品の製

造プロセスの完成度を向上させることに寄与できるものと考えている。

参考文献

1. バイオ・イノベーション研究会 報告書（経済産業省）2010 年：
<http://www.meti.go.jp/committee/summary/0004631/report02.pdf>
2. 医薬品産業ビジョン（経済産業省）2013 年：
http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuu/shinkou/dl/vision_2013b.pdf
3. 世界の医薬品メーカーの医薬品売上高ランキング（CSD ユート・ブレーン事業部の調査）：<http://www.utobrain.co.jp>
4. 外科系学会社会保険委員会連合ニュース 2006 年 9 月；第 5 号；1-5.：
<http://www.gaihoren.jp/gaihoren/public/doc/news5.pdf>
5. 特許でわかる免疫工学・バイオ医薬品_特許庁 HP 資料室：
http://www.jpo.go.jp/shiryou/s_sonota/map/kagaku11/frame.htm
6. 我が国で承認されたバイオ医薬品 国立医薬品食品衛生研究所 生物医薬品部 HP：
http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html
7. 抗体医薬の現状と課題：
http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt103j/0910_03_featurearticles/0910fa01/200910_fa01.html
8. これまでに日米欧で認可された抗体医薬品 国立医薬品食品衛生研究所：
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/Mab-T1.pdf>
9. 株式会社カイオム・バイオサイエンス 抗体医薬品開発の最新動向と今後の新展開：
<http://contents.xj-storage.jp/contents/45830/T/PDF-GENERAL/140120130509035001.pdf>
10. 乳がんの抗がん剤治療費について. Life Palette (2015)：
<http://lifepalette.jp/contents/show/261>
11. Genentech/Roche: UK's NICE remains negative over Avastin for colorectal cancer. on line news (2009)：
http://www.datamonitor.com/store/News/genentechroche_uks_nice_remains_negative_over_avastin_for_colorectal_cancer?productid=7DB5182F-6DB3-4000-BBF6-6A124A067FF7
12. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem. 2003;278:3466-73.
13. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol. 2004;22(11):1393-8.
14. Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. 25 Years of Recombinant Proteins From Reactor-Grown Cells - Where Do We Go From Here? Biotechnol Adv.; 2009;27(6):1023-7.

15. Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(5-6):671–85.
16. Shimoda C, Itadani A, Sugino A, Furusawa M. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading-deficient DNA polymerase delta as an effective mutator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst.* 2006;81:391–7.
17. Itakura M, Tabata K, Eda S, Mitsui H, Murakami K, Yasuda J, et al. Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated dnaQ gene. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7258–64.
18. Abe H, Takaoka Y, Chiba Y, Sato N, Ohgiya S, Itadani A, et al. Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology.* 2009;19:428–36.
19. Koyama Y, Banzai T, Sonezaki S, Kusano K. Stable expression of a heterogeneous gene introduced via gene targeting into the HPRT locus of human fibrosarcoma cells. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95:1052–60.
20. Kazuki Y, Oshimura M. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models. *Mol Ther.*; 2011;19(9):1591–601.
21. Oshimura M, Kazuki Y, Iida Y, Uno N. New Vectors for Gene Delivery: Human and Mouse Artificial Chromosomes. Chichester, UK:2013 May 30;1–12.
22. PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med.* 1958;108:945–56.
23. F T Kao TTP. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(4):1275–81.
24. Stanley P, Caillibot V, Siminovitch L. Stable alterations at the cell membrane of Chinese hamster ovary cells resistant to the cytotoxicity of phytohemagglutinin. *Somatic Cell Genet.* 1975;1:3–26.
25. Konrad MW, Storrie B, Glaser DA, Thompson LH. Clonal variation in colony morphology and growth of CHO cells cultured on agar. *Cell.* 1977;10:305–12.
26. Thompson LH, Fong S, Brookman K. Validation of conditions for efficient detection of HPRT and APRT mutations in suspension-cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 1980;74:21–36.
27. Flintoff WF, Davidson S V, Siminovitch L. Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genet.* 1976;2:245–61.
28. Urlaub G, Chasin LA. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:4216–20.
29. Urlaub G, Käs E, Carothers AM, Chasin LA. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell.* 1983;33:405–12.

30. Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, et al. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol Prog.* 2000;16:710–5.
31. 大政 健史監修 抗体医薬のための細胞構築と培養技術 (CMC 出版 2010 年)
32. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010;27:53–62.
33. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition.* Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. 2011.
34. LeFloch F, Tessier B, Chenuet S, Guillaume JM, Cans P, Goergen JL, et al. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology.* 2006;52:39–53.
35. Liu C-H, Chang T-Y. Rational development of serum-free medium for Chinese hamster ovary cells. *Process Biochem.* 2006;41(11):2314–9.
36. Ozturk SS, Palsson BO. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnol Bioeng.* 1991;37:35–46.
37. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnol Prog.* 2009;26:332–51.
38. Zhang J, Robinson D. Development of animal-free, protein-free and chemically-defined media for NS0 cell culture. *Cytotechnology.* 2005;48:59–74.
39. Li L, Qin J, Feng Q, Tang H, Liu R, Xu L, et al. Heparin promotes suspension adaptation process of CHO-TS28 cells by eliminating cell aggregation. *Mol Biotechnol.* 2011;47(1):9–17.
40. Astley K, Naciri M, Racher A, Al-Rubeai M. The role of p21cip1 in adaptation of CHO cells to suspension and protein-free culture. *J Biotechnol.* 2007;130(3):282–90.
41. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Cunnah P, Melton DW, Azeredo J, et al. Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169:1279–91.
42. Otto VI, Schürpf T, Folkers G, Cummings RD. Sialylated complex-type N-glycans enhance the signaling activity of soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(34):35201–9.
43. Isaji T, Im S, Gu W, Wang Y, Hang Q, Lu J, et al. An oncogenic protein Golgi phosphoprotein 3 up-regulates cell migration via sialylation. *J Biol Chem.* 2014;289(30):20694–705.
44. Choi SS, Rhee WJ, Kim EJ, Park TH. Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene. *Biotechnol Bioeng.* 2006;95:459–67.
45. Mastrangelo AJ, Hardwick JM, Zou S, Betenbaugh MJ. Part II. Overexpression of bcl-2

- family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67:555–64.
46. Figueroa B, Ailor E, Osborne D, Hardwick JM, Reff M, Betenbaugh MJ. Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2007;97:877–92.
 47. Meents H, Enenkel B, Eppenberger HM, Werner RG, Fussenegger M. Impact of coexpression and coamplification of sICAM and antiapoptosis determinants bcl-2/bcl-xL on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum-free media. *Biotechnol Bioeng.* 2002;80:706–16.
 48. Ibarra N, Watanabe S, Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Modulation of cell cycle for enhancement of antibody productivity in perfusion culture of NS0 cells. *Biotechnology Progress.* 2003.19. 224–8.
 49. Jung D, Côté S, Drouin M, Simard C, Lemieux R. Inducible expression of Bcl-XL restricts apoptosis resistance to the antibody secretion phase in hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2002;79:180–7.
 50. Figueroa B, Chen S, Oyler GA, Hardwick JM, Betenbaugh MJ. Aven and Bcl-xL Enhance Protection Against Apoptosis for Mammalian Cells Exposed to Various Culture Conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2004;85:589–600.
 51. Sauerwald TM, Betenbaugh MJ, Oyler GA. Inhibiting apoptosis in mammalian cell culture using the caspase inhibitor XIAP and deletion mutants. *Biotechnol Bioeng.* 2002;77:704–16.
 52. Sauerwald TM, Oyler GA, Betenbaugh MJ. Study of caspase inhibitors for limiting death in mammalian cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2003;81:329–40.
 53. Mercille S, Jolicoeur P, Gervais C, Paquette D, Mosser DD, Massie B. Dose-dependent reduction of apoptosis in nutrient-limited cultures of NS/0 myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene. *Biotechnol Bioeng.* 1999;63:516–28.
 54. Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP, Waalkes MP. Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;164:321–9.
 55. Kim NS, Lee GM. Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of caspase-3. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78:217–28.
 56. Sung YH, Lee JS, Park SH, Koo J, Lee GM. Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metab Eng.* 2007;9:452–64.
 57. Balcarcel RR, Stephanopoulos G. Rapamycin reduces hybridoma cell death and enhances monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 2001;76:1–10.

58. Linardos TI, Kalogerakis N, Behie LA. Cell cycle model for growth rate and death rate in continuous suspension hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng.* 1992;40:359–68.
59. Kim YH, Iida T, Fujita T, Terada S, Kitayama A, Ueda H, et al. Establishment of an apoptosis-resistant and growth-controllable cell line by transfecting with inducible antisense c-jun gene. *Biotechnol Bioeng.* 1998;58:65–72.
60. Bi JX, Shuttleworth J, Al-Rubeai M. Uncoupling of Cell Growth and Proliferation Results in Enhancement of Productivity in p21CIP1-Arrested CHO Cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004;85:741–9.
61. Oguchi S, Saito H, Tsukahara M, Tsumura H. pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture. *Cytotechnology.* 2006;52:199–207.
62. Sanfeliu A, Stephanopoulos G. Effect of glutamine limitation on the death of attached Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 1999;64:46–53.
63. Kim SH, Lee GM. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76:659–65.
64. Kim SH, Lee GM. Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74:152–9.
65. Park HS, Kim IH, Kim IY, Kim KH, Kim HJ. Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *J Biotechnol.* 2000;81:129–40.
66. Chen K, Liu Q, Xie L, Sharp PA, Wang DIC. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72:55–61.
67. Yoon SK, Hong JK, Choo SH, Song JY, Park HW, Lee GM. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *J Biotechnol.* 2006;122(4):463–72.
68. Hong JK, Kim YG, Yoon SK, Lee GM. Down-regulation of cold-inducible RNA-binding protein does not improve hypothermic growth of Chinese hamster ovary cells producing erythropoietin. *Metab Eng.* 2007;9:208–16.
69. Smales CM, Dinnis DM, Stansfield SH, Alete D, Sage EA, Birch JR, et al. Comparative proteomic analysis of GS-NSO murine myeloma cell lines with varying recombinant monoclonal antibody production rate. *Biotechnol Bioeng.* 2004;88:474–88.
70. Jones J, Nivitchanyong T, Giblin C, Ciccarone V, Judd D, Gorfien S, et al. Optimization of tetracycline-responsive recombinant protein production and effect on cell growth and ER stress in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 2005;91:722–32.

71. Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H. Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog.* 2005;21:106–11.
72. Davis R, Schooley K, Rasmussen B, Thomas J, Reddy P. Effect of PDI overexpression on recombinant protein secretion in CHO cells. *Biotechnol Prog.* 2000;16:736–43.
73. Jefferis R. Glycosylation of human IgG antibodies: Relevance to therapeutic applications. *BioPharm.* 2001;14:19–27.
74. Mohan C, Soon HP, Joo YC, Lee GM. Effect of doxycycline-regulated protein disulfide isomerase expression on the specific productivity of recombinant CHO cells: Thrombopoietin and antibody. *Biotechnol Bioeng.* 2007;98:611–5.
75. Dorner AJ, Krane MG, Kaufman RJ. Reduction of endogenous GRP78 levels improves secretion of a heterologous protein in CHO cells. *Mol Cell Biol.* 1988;8:4063–70.
76. Mohan C, Kim YG, Koo J, Lee GM. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. *Biotechnology Journal.* 2008. 3. 624–30.
77. Weikert S, Papac D, Briggs J, Cowfer D, Tom S, Gawlitzek M, et al. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 1999;17:1116–21.
78. Davies J, Jiang L, Pan LZ, Labarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FcγRIII. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74:288–94.
79. Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: Influence of golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous β 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi α -mannosidase II. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93:851–61.
80. Natsume A, Wakitani M, Yamane-Ohnuki N, Shoji-Hosaka E, Niwa R, Uchida K, et al. Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded bispecific antibody comprising of two single-chain antibodies linked to the antibody constant region. *J Biochem.* 2006;140:359–68.
81. Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, et al. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: An ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng.* 2004;87:614–22.
82. 矢野駿太郎 不均衡変異導入法を利用した産業用酵母の育種事例 2011年 第9号 生物工学 第89巻.524-526
83. 笠原堅. 産業用酵母育種に資する「不均衡変異導入法」～ゲノムワイドな変異スペクトル解析を中心に 第182回 酵母細胞研究会例会 (2012年)

84. Chang WP, Little JB. Evidence that DNA double-strand breaks initiate the phenotype of delayed reproductive death in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res.* 1992;131:53–9.
85. Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:679–714.
86. Kantardjieff A, Jacob NM, Yee JC, Epstein E, Kok Y-J, Philp R, et al. Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. *J Biotechnol.* 2010;145(2):143–59.
87. Beckmann TF, Krämer O, Klausning S, Heinrich C, Thüte T, Büntemeyer H, et al. Effects of high passage cultivation on CHO cells: A global analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;94:659–71.
88. Williams SR, Ousley FC, Vitez LJ, DuBridge RB. Rapid detection of homologous recombinants in nontransformed human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 6;91(25):11943–7.
89. Bronson SK, Plaehn EG, Kluckman KD, Hagaman JR, Maeda N, Smithies O. Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(17):9067–72.
90. Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg L a, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):3789–94. Available from:
91. Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling HJ, Kennedy M, Keller G. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1477–82.
92. Wirth D, Gama-Norton L, Riemer P, Sandhu U, Schucht R, Hauser H. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(5):411–9.
93. Choudhary R, Baturin D, Fosmire S, Freed B, Porter CC. Knockdown of HPRT for selection of genetically modified human hematopoietic progenitor cells. *PLoS One.* 2013;8(3):e59594.
94. Campbell M, Corisdeo S, McGee C, Kraichely D. Utilization of site-specific recombination for generating therapeutic protein producing cell lines. *Mol Biotechnol.* 2010;45(3):199–202.
95. Huang Y, Li Y, Wang YG, Gu X, Wang Y, Shen BF. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *J Immunol Methods.* 2007;322(1-2):28–39.
96. Obayashi H, Kawabe Y, Makitsubo H, Watanabe R, Kameyama Y, Huang S, et al. Accumulative gene integration into a pre-determined site using Cre/loxP. *J Biosci Bioeng. The Society for Biotechnology, Japan;* 2012;113(3):381–8.
97. Kennard ML, Goosney DL, Monteith D, Roe S, Fischer D, Mott J. Auditioning of CHO host cell lines using the artificial chromosome expression (ACE) technology. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104(3):526–39.

98. Kennard ML, Goosney DL, Monteith D, Zhang L, Moffat M, Fischer D, et al. The generation of stable, high MAb expressing CHO cell lines based on the artificial chromosome expression (ACE) technology. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104(3):540–53.
99. Fournier REK, Ruddle FH. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse , Chinese-hamster , and human somatic cells. 1977;74(1):319–23.
100. Combs RG, Yu E, Roe S, Piatchek MB, Jones HL, Mott J, et al. Fed-batch bioreactor performance and cell line stability evaluation of the artificial chromosome expression technology expressing an IgG1 in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 2010;27(1):201–8.
101. Lindenbaum M, Perkins E, Csonka E, Fleming E, Garcia L, Greene A, et al. A mammalian artificial chromosome engineering system (ACE System) applicable to biopharmaceutical protein production, transgenesis and gene-based cell therapy. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(21):e172.
102. Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4(11):1821–9.
103. Powell KT, Weaver JC. Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population. *Biotechnology (N Y).* 1990;8(4):333–7.
104. Weaver JC, McGrath P, Adams S. Gel microdrop technology for rapid isolation of rare and high producer cells. *Nat Med.* 1997;3(5):583–5.
105. Manz R, Assenmacher M, Pflüger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1921–5.
106. Borth N, Zeyda M, Kunert R, Katinger H. Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol Bioeng.* 2001;71(4):266–73.
107. Meng YG, Liang J, Wong WL, Chisholm V. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells. *Gene.* 2000;242(1-2):201–7.
108. DeMaria CT, Cairns V, Schwarz C, Zhang J, Guerin M, Zuena E, et al. Accelerated clone selection for recombinant CHO CELLS using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol Prog.* 2007;23(2):465–72.
109. Yoshikawa T, Nakanishi F, Ogura Y, Oi D, Omasa T, Katakura Y, et al. Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry. *Biotechnol Bioeng.* 2001;74(5):435–42.
110. Brezinsky SC., Chiang G, Szilvasi A, Mohan S, Shapiro R., MacLean A, et al. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific

- productivity. *J Immunol Methods*. 2003;277(1-2):141–55.
111. Shi S, Condon RG, Deng L, Saunders J, Hung F, Tsao YS, et al. A high-throughput automated platform for the development of manufacturing cell lines for protein therapeutics. *J Vis Exp*. 2011;(55):3–7.
 112. Frame KK, Hu W. Cell Volume Measurement as an Estimation of Mammalian Cell Biomass. 1990;36:191–7.
 113. Omasa T, Furuichi K, Iemura T, Katakura Y, Kishimoto M, Suga K-I. Enhanced antibody production following intermediate addition based on flux analysis in mammalian cell continuous culture. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2010;33(1):117–25.
 114. Takahashi, M., Kimura, S., Haghparast, SM., Cao, Y., Itoi, T., Shirai, A., Onitsuka, M., Omasa, T.: Relationship between chromosomal instability and cell characterization in Chinese hamster ovary cell lines. 25th Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) Meeting, p. 108, Nagoya (2012)
 115. Rameez S, Mostafa SS, Miller C, Shukla AA. High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: Reproducibility, scalability, and control. *Biotechnology Progress*. 2014;
 116. Ohshima A, Takamatsu Y, Yamamoto K, Saitoh H. Efficient Selection of Cell Clones with Higher Productivity in the Production of Recombinant Human Monoclonal Antibodies. Kamihira M, Katakura Y, Ito A, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010;83–8.
 117. Chen A, Chitta R, Chang D, Amanullah A. Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(1):148–60.
 118. Deshpande RR, Heinzle E. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. 2004;763–7.

謝辞

本研究を遂行し本学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 大政 健史教授に心より厚く感謝致します。

本学位論文を作成するにあたり、数々の有益なご意見、ご助言を頂きました、徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 宇都 義浩教授に深く感謝致します。

本学位論文を作成するにあたり、有益なご意見、ご助言を頂きました、徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 櫻谷 英治教授に深く感謝致します。

本学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援を賜りました徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 大政研究室の皆様心より感謝致します。

レクチンアレイ解析及びレクチンキャプチャーを実施するにあたり、多大なるご支援を賜りました独立行政法人 産業技術総合研究所糖鎖創薬技術研究センター上級主任研究員 久野 敦博士ならびに水田 詩織氏に深く感謝致します。

「抗体生産能向上を目指した不均衡変異導入による宿主改変」の共同研究を実施するにあたり、技術提供および多大なるご支援を賜りました株式会社ネオ・モルガン研究所取締役 堀内 貴之博士ならびに窪田みち氏に深く感謝致します。

「*hppt* 遺伝子座を標的とした抗体遺伝子導入方法」の共同研究を実施するにあたり、技術提供および多大なるご支援を賜りました TOTO 株式会社 総合研究所 バイオ研究部 バイオ研究グループ 山名 良正博士ならびに近藤 雅子氏に深く感謝致します。

「マウス由来人工染色体 (MAC) ベクターを利用した抗体生産株の構築」の共同研究を実施するにあたり、技術提供および多大なるご支援を賜りました鳥取大学大学院医学系研究科 押村 光雄教授ならびに香月 康宏助教、押村研究室の方々、さらに株式会社 chromocenter 研究開発部の方々に深く感謝致します。

本研究にあたり、透過型電子顕微鏡観察を実施して頂きました第一三共 RD ノバーレ株式会社 創薬基盤研究部 生物解析・抗体グループ 岡戸 恵子氏に深く感謝致します。

本研究にあたり、ご協力、ご支援頂きました北里第一三共ワクチン株式会社 新型インフルエンザ公募事業推進部プロセス検討グループ 宮台 健司氏に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂いた第一三共株式会社 研究開発本部 バイオ統括部長 古賀 淳一博士、第一三共株式会社 研究開発本部 バイオ統括部 バイオ医薬研究所長 簗田 雅之博士に深く感謝致します。

本研究に際し、直接のご指導を頂き、本論文の作成にあたっても多大なるご尽力を頂

いた第一三共株式会社 研究開発本部 バイオ統括部 バイオ医薬研究所 第一グループ長
野中 浩一博士に心より感謝致します。

さらに、本研究にあたり、ご協力、ご支援頂きました第一三共株式会社 研究開発本部
バイオ統括部 バイオ医薬研究所 第一グループ 大峰 寿典氏、渡辺 和彦氏、増田 謙治
氏、石川 直人氏を始めとする第一グループの方々に感謝致します。